

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 5 月 25 日 (25.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/36677 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, 1/02,
1/04, C12N 15/09, G01N 33/566, 33/53, 33/15 // C07D
487/04, A61K 31/4178, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07992

(22) 国際出願日: 2000 年 11 月 13 日 (13.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/326007

1999 年 11 月 16 日 (16.11.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本
町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 弘

(SUGIYAMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒102-0081 東京都千代
田区四番町 8-611 Tokyo (JP). 齋藤 烈 (SAITO, Isao)
[JP/JP]; 〒607-8242 京都府京都市山科区勤修寺柴山
1-21 Kyoto (JP). 飯田博一 (IIDA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒
112-0002 東京都文京区小石川 5-31-5 ビラしんび 303
Tokyo (JP).

(74) 代理人: 佐伯憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区日本橋三丁目 15 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。



WO 01/36677 A1

(54) Title: DEVELOPMENT OF METHOD FOR SCREENING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PYRROLE IMIDAZOLE
DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 生理活性をもつピロールイミダゾール誘導体のスクリーニング法の開発

(57) Abstract: A method for screening the effect of a segment A (chemical species A) on a substance (for example, a cell) containing
DNA or RNA by using artificial chemical species. Namely, a method of detecting or identifying the function of a chemical species
A on a substance containing DNA or RNA by using one or more chemical species represented by the following general formula (I)
which are capable of recognizing a DNA base sequence; a kit therefor; and a plate to be used therein: B-L-A (I) wherein B represents
a chemical structure containing a non-natural base capable of recognizing a DNA base sequence; A represents a chemical structure
having an interaction with DNA; and L represents a linker whereby the chemical structures A and B can be linked together.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、これらの人工の化学種を用いて細胞などのDNA又はRNAを含有する物質に対するセグメントA（化学種A）の作用をスクリーニングする方法を提供するものである。

本発明は、一般式（I）



（式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。）

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種の1種又は2種以上を用いて、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法、そのためのキット、及びそれに用いるプレートに関する。

明 細 書

生理活性をもつピロールイミダゾール誘導体のスクリーニング法の開発

技術分野

本発明は、天然のDNA又はRNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を有する化学種を用いて、細胞などのDNA又はRNAを含有する物質に対する作用を検出または同定する方法、そのためのキット、及びそれに用いるプレートに関する。

背景技術

ヒトゲノムプロジェクトにより我々の「生命の設計図」である全遺伝子の塩基配列が数年内に解明されようとしている。この設計図に傷があったり、後天的に傷はいると、病気や老化を引き起こすことが知られている。ヒトゲノムプロジェクトの進展により癌を含む多くの疾病はDNAレベルで理解されるようになり、診断、予防などを中心とした医学全体が、革命的に変化するものと考えられる。さらに、これらの疾病のDNAレベルでの理解に基づいた治療法、すなわち病因遺伝子やその産物をターゲットとした医薬品の開発への期待も大きい。基礎研究を臨床研究に活かしていくための橋渡しの研究は、まだ途についたばかりである。現在、用いられている抗癌剤は、スクリーニングによって選択された抗生物質が多く、もともと癌細胞を殺すために微生物が産生したものではなく、癌の分子生物学的知見に基づいたものはほとんどない。細胞内の特定遺伝子の発現を細胞外から自由自在にコントロールすることが可能になれば、究極の遺伝子レベルでの治療法となると考えられる。

本発明者らは、最近、抗生物質デュオカルマイシンがディスタマイシンなどの他種分子とヘテロダイマーを形成し協同的にDNAの分子認識を行ない、デュオカルマイシン単独の場合とは異なる塩基配列を効率よくアルキル化することを発見した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14405, 1996)。この結果をもとにデュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロールイミダゾールボ

リアミドを結合させ、任意の塩基配列でDNAを選択的にアルキル化する分子の合成に成功し、特許出願をした（特願平10-260710号）。

しかし、デュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロールイミダゾールポリアミドを結合させだけの化合物ではアルキル化能が十分だけでなく、これらの化合物は1本鎖の塩基配列しか認識できないものであった。そこで、本発明者らは、これらの化合物の分子動力学などのコンピュータモデリングを用いてこれらの分子とDNAとのアルキル化を詳細に検討し、デュオカルマイシンの反応性のあるシクロプロパン部分（セグメントA）にビニル基などのリンカーを導入することにより、2本鎖DNAを同時にアルキル化し切断することを見出した（特願平11-83591号）。

これらの天然のDNAやRNAの塩基配列を認識する人工の化学種は、天然のDNAやRNAの特定の塩基配列に認識して当該特定の位置においてセグメントAの作用をDNAやRNAに及ぼすものであることから、本発明者らは天然のDNAやRNAの部分配列に代えてこれらの人工の化学種を応用することができることを見出した。

発明の開示

本発明は、これらの人工の化学種を用いて細胞などのDNA又はRNAを含有する物質に対するセグメントA（化学種A）の作用をスクリーニングする方法を提供するものである。

本発明は、一般式（I）



（式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。）

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種を用いて、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法に関する。

より詳細には、本発明は、多数のウェルを有するプレート中の各ウェルにDN

A又はRNAの塩基配列を認識することができる一般式(I)で表される化合物を存在させ、当該プレートの各ウェルにDNA又はRNAを含有する物質を導入し、一般式(I)で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを十分に作用させた後、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定することからなるDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法に関する。

さらに詳細には、本発明は、前記の方法において、各ウェルに存在させる一般式(I)で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの異なる塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が同じ物質である前記した方法に関する。

また、本発明は、前記した方法において、各ウェルに存在させる一般式(I)で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの特定の1種類の塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が異なる物質である前記した方法に関する。

また、本発明は、前記した各種の方法を行うための、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキットに関する。

より詳細には、本発明は、一般式(I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種、及び作用後のDNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段のための器具又は試薬からなる、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのキットに関する。

さらに、本発明は、複数のウェルを有するプレート中の各ウェルに、一般式(I)、



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有す

る化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種が存在してなる複数のウェルを有するプレートに関し、当該プレートがDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのものであるプレートに関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のImPyLDu86とDNAとの反応の結果を示した、図面に代わる写真である。

第2図は、第1図の実験に使用したDNAの塩基配列及びImPyLDu86の化学構造を示したものである。

第3図は、本発明のプレートを用いた癌細胞に特異的な抗癌剤をスクリーニングする方法を例示したものである。

第4図は、本発明の化合物1～16の100nMの濃度における癌細胞の生存率を示したものである。

第5図は、本発明のプレートを用いて、本発明の化合物を単独で使った場合とこれらを混合して使った場合を同時に試験する方法を例示したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の前記一般式(I)における、DNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造であるBは、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造が好ましい。ピロールやイミダゾールの置換基としては、DNAの塩基配列を認識する妨げとならないものであれば特に制限はなく、例えば、炭素数1～10、好ましくは1～5の直鎖又は分枝状のアルキル基、前記したアルキル基から誘導されるアルコキシ基、水酸基、アミノ基、前記したアルキル基から誘導されるN-アルキル置換アミノ基、有機カルボン酸から誘導されるN-アシルアミノ基、グアニジノ基、置換グアニジノ基などが挙げられる。例えば、N-メチルピロール、N-メチルイミダゾール、3-ヒドロキシピロール、N-メチル-3-ヒドロキシピロールなどが挙げられ

る。

これらの天然の塩基配列を認識し得る非天然型の塩基は、主鎖上又は主鎖に懸垂されていてもよい。これらの非天然型の塩基が主鎖上に存在する場合には、これらの非天然型の塩基自体が主鎖を形成するための官能基を有しており、例えば非天然型の塩基の一端にカルボキシル基を有し、他端にアミノ基を有し、これらがポリアミド構造を形成するようにすればよい。主鎖を形成する構造は、前記ポリアミド構造に限定されるものではなく、ポリエステル構造やポリイミン構造などの重合体を形成し得るものであってもよい。

また、主鎖に懸垂される場合には、天然のDNAやRNAのように多糖類の構造に懸垂されていてもよいし、合成の重合体の構造に懸垂されていてもよい。

好ましいDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造であるBとしては、より具体的にはピロール-イミダゾールポリアミド結合が好ましい。ピロールやイミダゾールの長さ（個数）は特に制限はないが、好ましくは2～30個、より好ましくは24～16個、さらに好ましくは4～16個程度である。

DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造部分であるAとしては、DNAやRNAと相互作用をするものであれば種々の化学種を使用することができる。好ましい化学種A（セグメントA）の構造としては、抗癌作用を有する化学物質の構造が挙げられる。抗癌作用を有する化学物質としては、DNAに作用するアルキル化剤が好ましい。より好ましくは、シクロプロパン環を有する化学構造が挙げられ、デュオカルマイシンのアルキル化部分がより好ましい。

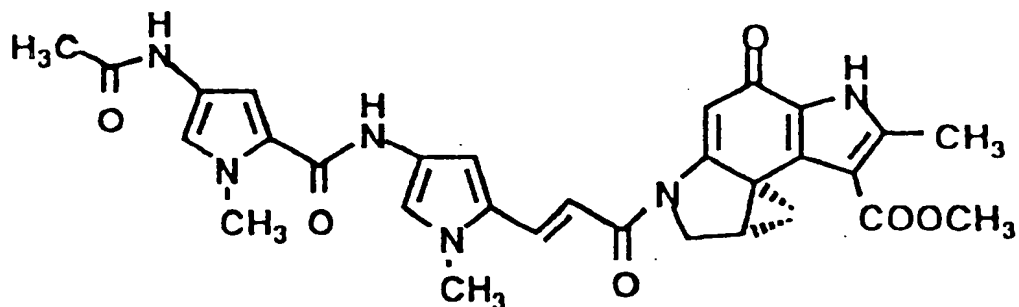
A及びBの化学構造を結合させ得るリンカー部分Lとしては、セグメントAとセグメントBとを適当な距離で隔てることができ、かつ、アルキル化活性を失活させないものが好ましい。好ましい具体例としてはビニル基を含有する化学構造が挙げられる。

これらの一般式（I）で表される化合物はこれを単独で使用することもできるが、これらの2種以上を混合して使用することもできる。2種以上の一般式

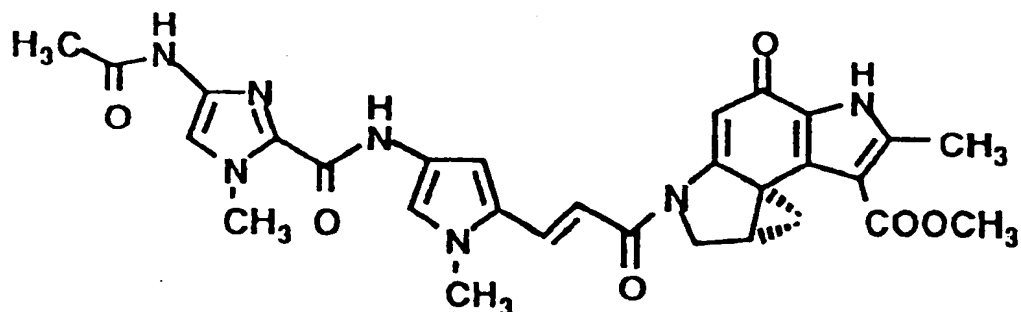
（I）であらわされる化合物を混合して使用する場合には、種々の混合パターンがあるが、一般的には化学種B（セグメントB）の異なる化学種を混合するのが

好ましいが、これに限定されるものではない。

一般式 (I) で表される本発明の化合物の好ましいものとしては、次式



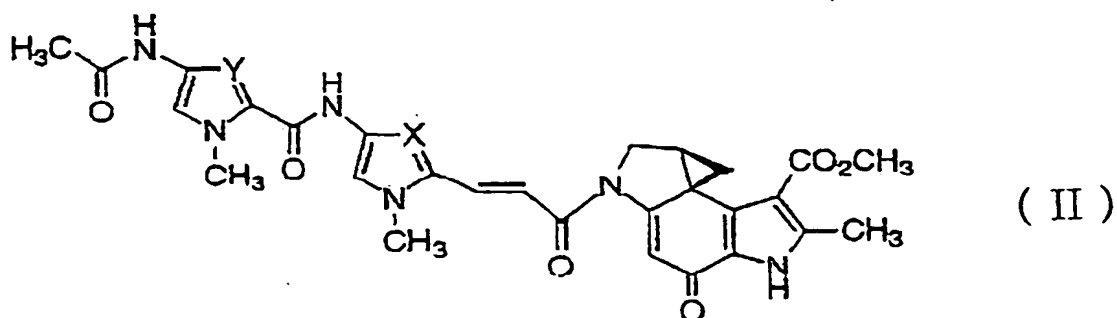
で表される化合物 (以下、「PyPyLDu86」という。)、又は



で表される化合物 (以下、「ImPyLDu86」という。) が挙げられる。

前記した化合物は、塩基配列 TGACG をはじめとする ImPyLDU86 に対応する配列群、又はそれらの相補鎖を認識する。

さらに、次式の PyPyLDu86 を基本構造とする {Py 又は Im} {Py 又は Im} LDu86 の構造を有する一般式 (II)、



(式中、X及びYはそれぞれ独立して－CH＝又は－N＝を示す。)

で表される化合物やこれらの1：1混合物が挙げられる。

以下の説明のためにこれらの化合物又はこれらの混合物に次のように番号を付ける。

XがCHで、YがCHの場合の化合物を、化合物1とし、

XがCHで、YがNの場合の化合物を、化合物2とし、

XがNで、YがCHの場合の化合物を、化合物3とし、

XがNで、YがNの場合の化合物を、化合物4とし、

化合物1と化合物2の1：1の混合物を、化合物5とし、

化合物1と化合物3の1：1の混合物を、化合物6とし、

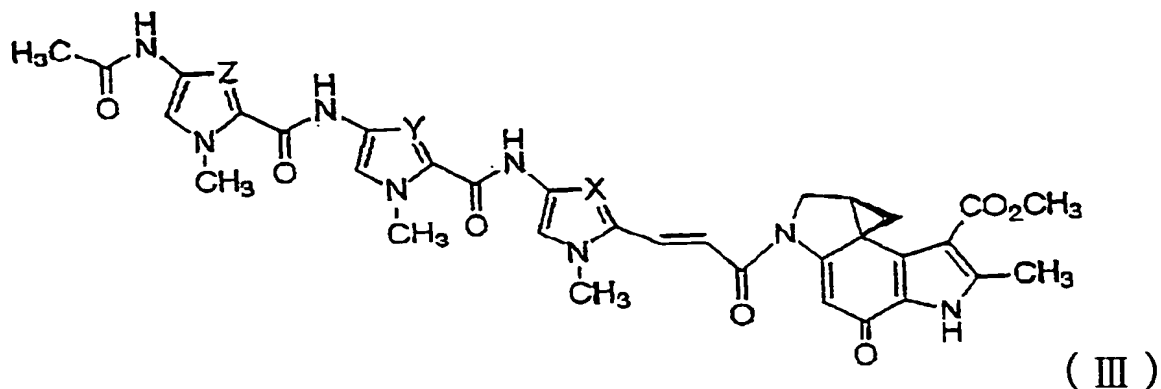
化合物1と化合物4の1：1の混合物を、化合物7とし、

化合物2と化合物3の1：1の混合物を、化合物8とし、

化合物2と化合物4の1：1の混合物を、化合物9とし、

化合物3と化合物4の1：1の混合物を、化合物10とする。

また、次式のPyPyPyLDu86を基本構造とする{Py又はIm}{Py又はIm}{Py又はIm}LDu86の構造を有する一般式(III)、



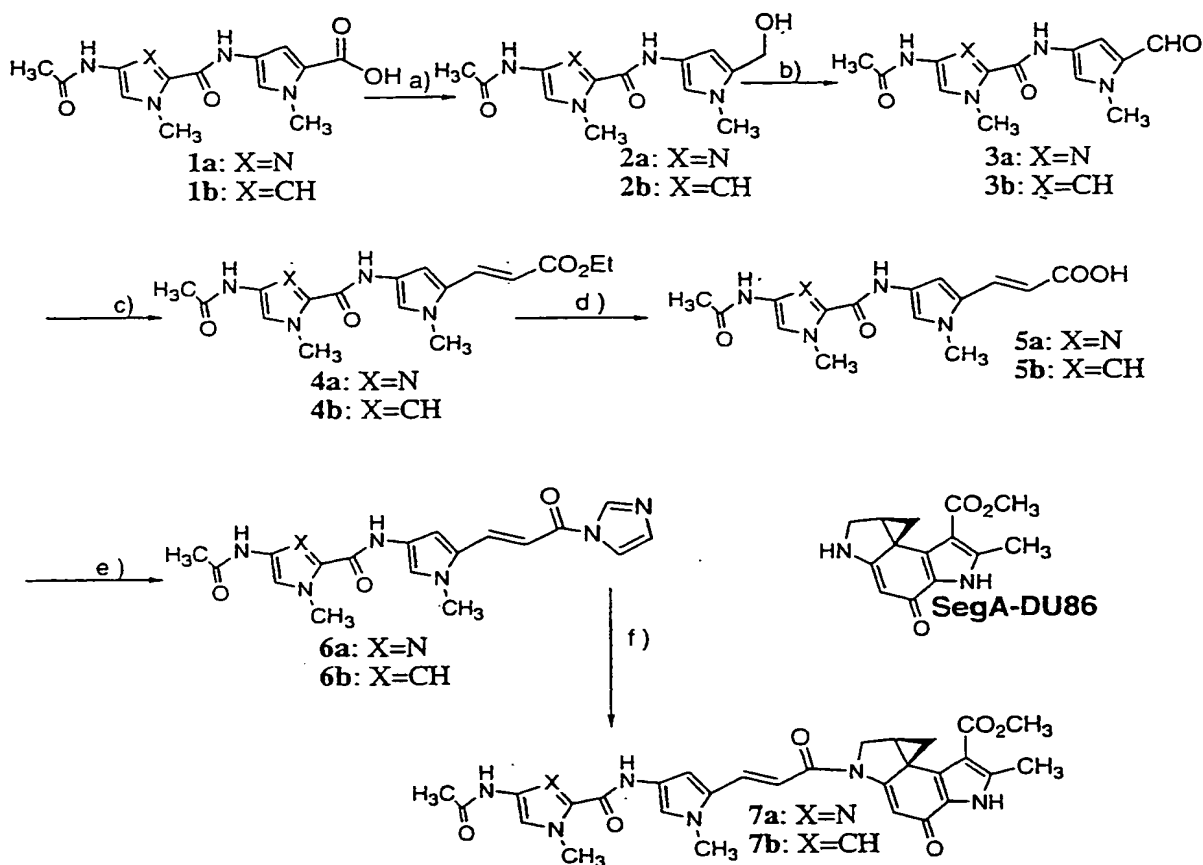
(式中、X、Y及びZはそれぞれ独立して $-CH=$ 又は $-N=$ を示す。)
で表される化合物やこれらの1 : 1混合物が挙げられる。

以下の説明のためにこれらの化合物又はこれらの混合物に次のように番号を付ける。

XがCHで、YがNで、ZがNの場合の化合物を、化合物11とし、
XがCHで、YがNで、ZがCHの場合の化合物を、化合物12とし、
XがCHで、YがCHで、ZがCHの場合の化合物を、化合物13とし、
化合物11と化合物12の1 : 1の混合物を、化合物14とし、
化合物11と化合物13の1 : 1の混合物を、化合物15とし、
化合物12と化合物13の1 : 1の混合物を、化合物16とする。
これらの化合物1 ~ 16について後述する試験を行った。

本発明の一般式(I)で表される化合物は、公知の方法に準じて製造することができる。即ち、Aセグメント及びBセグメントを常法により製造し、これに順次リンカーセグメントLを結合させ、次いで残りのセグメントを結合させることにより製造することができる。

例えば、前記のImPyLDu86(7a)及びPyPyLDu86(7b)の製造例を次の化学反応式で示す。反応式中の各化合物の下に数字は化合物の番号を示す。



反応式中の a) はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (BOP) の THF 溶液中での処理、次いで NaBH_4 処理を示し、b) は THF 中での MnO_2 処理を示し、c) は THF 中でのトリエチルホスホノアセテート及び NaH 処理を示し、d) は水-メタノール中での水酸化ナトリウムによる処理を示し、e) は DMF 中での 1,1-カルボニルジイミダゾールでの処理を示し、f) は DMF 中での水素化ナトリウムを用いた DU86 のセグメント A との処理を示す。

こうして合成された PyPyLDu86 および、ImPyLDu86 の DNA との反応性を調べた。ImPyLDu86 によるアルキル化の結果を第 1 図に示した。この実験に用いた DNA 及び使用した ImPyLDu86 を第 2 図に示す。

第1図において、左側の泳動図は2本鎖DNAの上のストランドの結果、右側の泳動図は下のストランドの結果である。アルキル化の位置は加熱により切断バンドとしてみることができる。その結果、低濃度から主に2本鎖DNAはサイト1とサイト2で2本鎖の切断されていることがわかり、アルキル化が2本鎖で同時に起っていることが判断できる。このような切断を引き起こす化合物はこれまでに例がなく、まさに人工の制限酵素といえることができる。また用いたImPyLDu86の量から70%の高率で切断が起っていることが判明し、以前に合成した分子（特願平10-260710号参照）にくらべて非常に高い効率であることがわかる。

DNA又はRNAを含有する物質としては、DNAやRNAそれ自体を使用することもできるが、生きている細胞を使用するのが好ましい。セグメントAとして抗癌剤を用いる場合には癌細胞を使用することができる。

一般式(I)におけるセグメントBにおいて、非天然型の塩基としてメチルピロール(Py)及びメチルイミダゾール(Im)を使用する場合には、Py-ImによりC-G塩基対が、Im-PyによりG-C塩基対が、Py-PyによりA-TまたはT-A塩基対が認識されることが知られているから、メチルピロール(Py)及びメチルイミダゾール(Im)を適宜組み合わせることにより、目的の塩基配列を認識させることができる。即ち、メチルピロール(Py)及びメチルイミダゾール(Im)を、3個(3量体)用いることにより天然の3塩基の配列を認識することができ、4個(4量体)用いることにより天然の4塩基の配列を認識することができる。

また、これらのセグメントBの配列を有する化合物の2種以上混合して使用することもできる。

本発明の方法は、一般式(I)で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを十分に作用させた後、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定することにより、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定することができる。

一般式(I)で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを十分に作用させる手段としては、両者を適当な緩衝液中でインキュベーションするなど

の方法により行うことができる。また、インキュベーションの後の、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段としては、各種の標識化や着色法などの手段により行うことができる。インキュベーションの後の、DNA又はRNAを含有する物質の状態に応じて適宜その手段を選択することができる。

DNA又はRNAを含有する物質として生きている細胞を用い、その生死によって判定する場合には、細胞を着色する方法が簡便で好ましい。市販のセルカウティングキットを、又はこれと着色における吸光度とを併用することにより生存細胞を定量化することもできる。

次に本発明の具体的な使用例について説明する。

第3図は本発明の方法を例示したものである。第3図の左側にマス目のように示されているのは、複数のウェルを有するプレートであり、各マス目が各ウェルを示している。この例では96穴のプレートが示されている。この各ウェルに本発明の前記一般式(I)で表される化学種を存在させておく。各ウェルに異なる塩基配列を認識する本発明の一般式(I)で表される化学種を存在させておく場合についてまず説明する。

例えば、4量体では、一般式(I)で表される化学種のセグメントBの部分に、メチルピロール(Py)及びメチルイミダゾール(Im)からなる非天然型の塩基を用いて、Py-Py-Py-Py、Py-Py-Py-Im、Py-Py-Im-Py、Im-Im-Im-PyなどのPyとImからなるすべての順列組み合わせの構造(この例では16通りになる)を用いて異なる3塩基を認識し得るものができる。一般式(I)のセグメントAの部分にアルキル化剤を結合させて、ビニル基を含むリンカーLで結合させる。

そして、このセグメントBの部分異なる16種類の化学種を第3図の左側にしめされるプレートの各ウェルに入れる。次いで、各ウェルに癌細胞を入れ、数時間～数日間これをインキュベートさせると、癌細胞の特定の塩基配列部分を認識した本発明の一般式(I)で表される化学種は癌細胞のDNAと反応してこれをアルキル化して癌細胞を殺すことになる。その結果を示したのが第3図の右側である。第3図の右側は、前記のインキュベーションが終了した後、各ウェルを着色し、細胞が生きている場合は着色剤により着色されて第3図では黒く示されてい

るが、細胞が死んで着色剤により着色されない場合には第3図では白く示されている。第3図の例ではセグメントBとして8量体を使用した例であり、3種の非天然型の塩基の配列において癌細胞が死滅したことが示されている。各ウェルに存在させた非天然型の塩基の配列は予め判っているから、この試験によりどの配列の場合に癌細胞が死滅したかを知ることができる。

第3図の例では、8量体が使用されており、2の8乗、即ち256通りのセグメントB部分を有する一般式(I)で表される化学種が各ウェルに存在させられており、この例ではこのうち3種類の配列のものが特異的に癌細胞を死滅させていることがわかる。この3種の配列はこの例では、

P y I m P y P y P y I m P y P y、

P y I m P y P y P y I m I m P y、及び、

I m I m P y P y P y I m P y P y、

であることがわかる。

癌細胞は、その種類や生物に応じて異なっており、本発明の前記に示した方法によれば、測定された検体としての癌細胞に特異的に作用する抗癌剤を、短時間で、簡便に検索することができる。また、癌細胞は同じ組織の癌細胞であっても時期に応じて変異する場合があります、このような場合においても変異した癌細胞に特異的な抗癌剤を本発明の方法により簡便に検索することができる。さらに、本発明の前記方法によれば、癌組織の周囲の正常細胞に対する抗癌剤の作用をも同様な方法で調べることができる。

したがって、本発明の方法は、正常細胞には影響を与えず、目的の癌細胞に特異的に作用する抗癌剤を短時間で、簡便に検索することができる方法を提供するものである。

次に前記した化合物1～16についてその活性を評価した。

ピロール(Py)、イミダゾール(Im)アミド部が合計2つ或いは3つで構成されている化合物群を用いて細胞毒性試験を行った。前記の化合物1～16の16種類を用い、その効果を細胞の生存率で示した結果を第4図に示す。ヒト癌細胞LCL-wt、HLC-2、ヒト白血病細胞Jurkat、を用いて一斉スクリーニングを行った場合、LCL-wtに対してのみ化合物14が高い細胞毒

性を示し、J u r k a t と H L C - 2 に対しては有用な結果が示されなかった。

第 4 図は、100 nM の濃度における L C L - w t と J u r k a t に対する化合物群 1 ~ 16 の細胞毒性の試験結果を示したものである。

このように、本発明の一般式 (I) で示される化合物の 2 種以上の混合物も特異的な活性を示すことが明らかになり、このような混合物に対する試験方法の例を第 5 図に示す。第 5 図は、 $8 \times 8 = 64$ ウェルを用いた試験を示す。

セグメント B の部分が 3 個の認識部位になる場合を例示しており、認識コンポーネントとしてピロール系 (P y) とイミダゾール系 (I m) を用いた場合には 2 の 3 乗種類、即ち 8 種類の組み合わせが考えられる。この 8 種を縦横各々 $25 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに入れる。例えば、プレートの 1 行目と 1 列目に各々 $25 \mu\text{l}$ の P y - P y - P y を入れ、次いでプレートの 2 行目と 2 列目に各々 $25 \mu\text{l}$ の P y - I m - P y を入れ、さらにプレートの 3 行目と 3 列目に各々 $25 \mu\text{l}$ の P y - P y - I m を入れるというように、8 種の化合物を各々の行及び列に入れていくことにより、プレートの対角線上の部分のウェルは 1 種類の化合物のみとなるが、対角線の部分以外のウェルには各々異なる 2 種類の化合物からなる 1 : 1 の混合物が入れられたことになる。そして、第 3 図に示した方法と同様にして癌細胞とインキュベーションした後、これを着色処理した結果が第 5 図に例示されている。

第 5 図の例では、3 行 3 列目、2 行 6 列目及び 6 行 2 列目、並びに 4 行 8 列目及び 8 行 4 列目で癌細胞の死滅が観察されている。これは、この癌細胞に対しては 3 行 3 列目これは対角線の部分のウェルであるから、即ち P y - P y - I m の配単独で癌細胞を死滅させていることがわかり、2 行 6 列目及び 6 行 2 列目、並びに 4 行 8 列目及び 8 行 4 列目は各々対角線に対して対象の位置であり、前者では P y - I m - P y と I m - P y - I m の 1 : 1 混合物であり、後者は P y - I m - P y と I m - I m - I m との 1 : 1 混合物である。そしてこの例ではこの癌細胞に対してはこれらのセグメント B を有する化合物又は混合物が特異的に有効であることが示されている。

さらに、この試験例において重要なことは、一般式 (I) の化合物の癌細胞に対する有効性がこの化合物を単独で使用する場合には示されないが、他の化合物

と混合して使用した場合に初めてその有効性が示される場合があることを明らかにしているということである。

このような本発明の試験方法により、一般式 (I) で表される化合物を単独で用いた場合の結果を得ると同時に、これらの化合物を混合して使用した場合の結果をも得ることができる。

以上の例は、癌細胞に特異的な抗癌剤を検索する方法であるが、特定の塩基配列の位置において有効性が知られている癌細胞をDNA又はRNAを含有する物質として使用し、当該塩基配列に対応した本発明の一般式 (I) のセグメントBの部分に有する化学種を調製し、そのセグメントAの部分に各種の抗癌剤の候補化合物を結合させた、セグメントAの部分異なる複数種の本発明の一般式

(I) で表される化学種を各ウェルに存在させ、これを前記の癌細胞とインキュベートさせることにより、セグメントAの部分の抗癌剤の候補化合物の作用を検索することができる。

即ち、本発明のひとつの実施形態としては、本発明の一般式 (I) のセグメントAの部分に抗癌剤の候補化合物を結合させることにより、癌細胞に対する抗癌作用をスクリーニングする方法を提供するものである。

また、本発明は、前記してきた各種の本発明の方法を行うための、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキットを提供するものである。

より詳細には、一般式 (I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種、及び作用後のDNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段のための器具又は試薬からなるDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキットを提供する。前述したように、本発明の一般式 (I) の化合物はこれを単独で使用してもよいが、この2種以上を混合して使用できるようにしておいてもよい。

さらに、本発明は、複数のウェルを有するプレート中の各ウェルに、一般式 (I)、



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種が存在してなる複数のウェルを有するプレートを提供するものである。より詳細には、本発明のプレートは、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのプレートである。

前記の一般式 (I) で表される化合物は、この1種又は2種以上をプレートの各ウェルに固定化しておくこともできる。また、溶液又はゲル状にしておくこともできる。

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例

実施例1 (細胞毒性試験による制癌効果の評価)

腫瘍細胞として、ヒト癌細胞LCL-wtとHLC-2、ヒト白血病細胞、Jurkat、ヒト子宮けい癌細胞HeLa cellを用いた。LCL-wtとJurkatに対してはPRMI 1640 (Gibco BRL) + 10%牛胎児血清 (JRH BIOSCIENCES) + 100 μ U/ml ペニシリンG - 100 μ U/ml ストレプトマイシン硫酸塩 (Gibco BRL) を培養培地として用いた。HLC-2に対してはMEM + 10%牛胎児血清 (JRH BIOSCIENCES) + 100 μ U/ml ペニシリンG - 100 μ U/ml ストレプトマイシン硫酸塩 (Gibco BRL) を培養培地として用いた。ヘラ細胞 (HeLa cell) に対してはRBMI + 10%牛胎児血清 (JRH B

IOCIENCES) + 100 μ U/ml ペニシリン G - 100 μ U/ml ストレプトマイシン硫酸塩 (Gibco BRL) を培養培地として用いた。それぞれの細胞は培養し、対数増殖期にあるものを分散してスクリーニングに用いた。

スクリーニングは、初期細胞数を約 2×10^5 cells/ml に調整した細胞懸濁液を 96 ウェルのマルチプレートに 50 μ l/ウェルずつ分注し、試験化合物の試験溶液 (100 μ M、培地 + 0.1% DMSO) を添加し、37℃、CO₂ 濃度 5% の条件下、インキュベーターで 2 日間前培養を行い、その後細胞数をカウントした。

細胞数は、マイクロプレートリーダー (Micro Plate Reader) (MPR-A4i、TOSOH) と血球計算板を用いて計算した。マイクロプレートリーダーを用いた測定においては、セルカウティングキット 8 (Cell Counting Kit-8) (DOJINDO) を用い、測定波長 450 nm (参照波長 600 nm) で吸光度を測定した。生細胞数、死細胞数のカウントはトリパンブルーを用いた色素排除法により顕微鏡下で行った。マイクロプレートリーダーと血球計算板での測定結果を元に生存率を以下の式により算出した。

$$\text{生存率} = 100 n_p / n_c$$

ここで、 n_p は試料を添加した場合の生細胞数、 n_c はコントロール生細胞数である。

実施例 2 (細胞毒性試験)

本文中に記載した化合物 1 ~ 16 を用いて、本発明のプレートによりヒト癌細胞 LCL-wt、HLC-2、ヒト白血病細胞 Jurkat、を用いて一斉スクリーニングを行った。

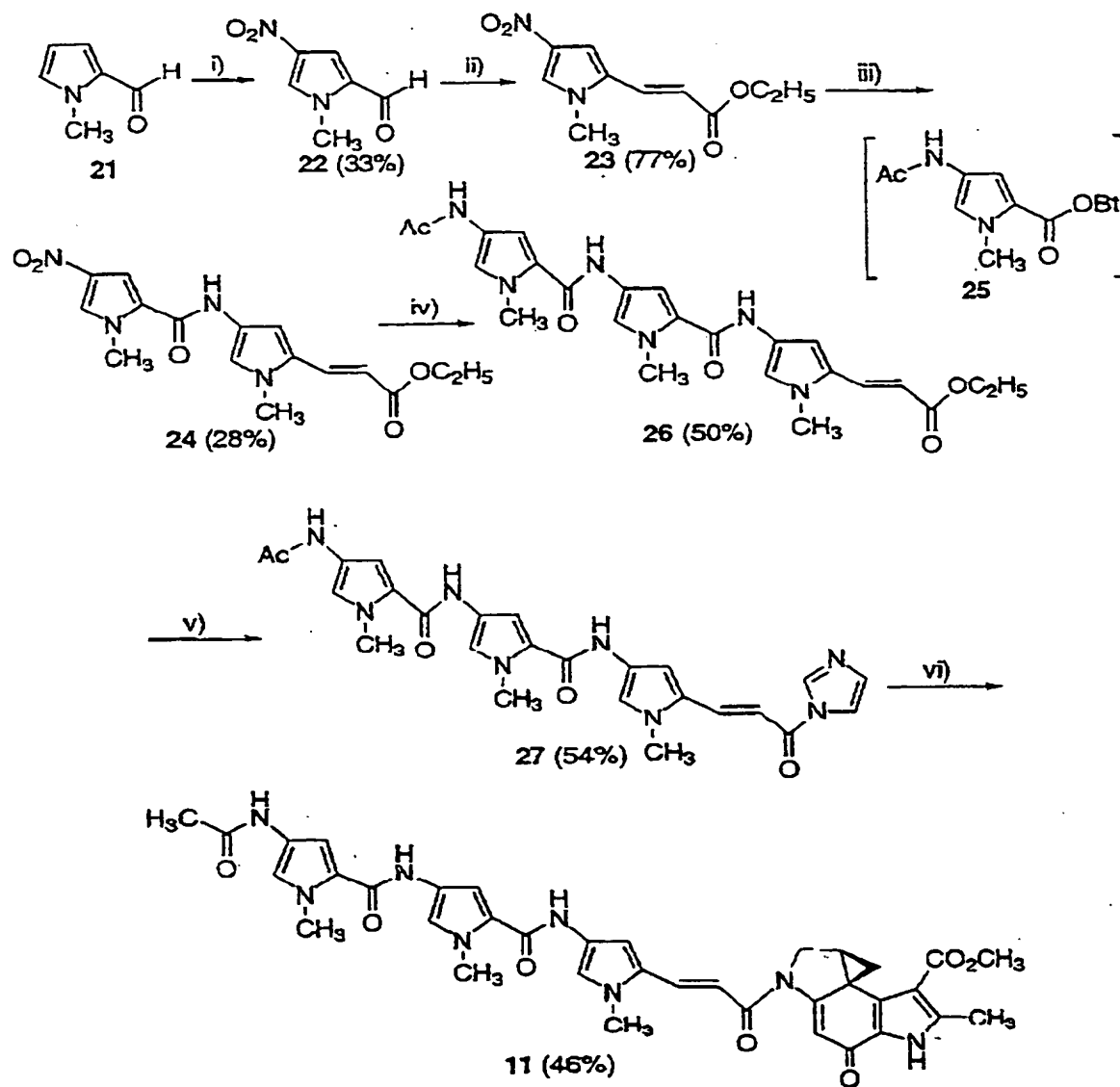
その結果を実施例 1 と同様に行って、各細胞の生存率を計算した。

第 4 図に試験化合物の濃度が 100 nM の場合の結果を示す。

この結果によれば、LCL-wt に対してのみ化合物 14 が高い細胞毒性を示すことがわかった。

実施例 3 (化合物の合成)

化合物 13 の合成方法を次に示した。



反応及び精製に用いた試薬、溶媒は市販のものを用いた。プロトン核磁気共鳴スペクトル (NMR) は日本電子 JNM-A500 を使用し、テトラメチルシラン (TMS) を内部標準物質として化学シフトは δ 値 (ppm) で示した。シグナルの略号として、s (singlet)、d (doublet)、t (triplet)、q (quarter)、m (multiplet)、br (broad)、br s (broad singlet) を用いた。試薬、溶媒の略号

は以下のように用いた。ジメチルホルムアミド (DMF)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、カルボニルジイミダゾール e (CDI)、4-(ジメチル)アミノピリジン (DMAPI)、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDCI)、テトラヒドロフラン (THF)。反応は特に示さない限り、アルゴン雰囲気下或いは窒素雰囲気下で行った。

(1) 1-メチル-4-ニトロ-ピロール-2-アルデヒド (22)

発煙硝酸 (1.5 ml, 37.5 mmol) の無水酢酸 (25 ml) 溶液を -30℃ に冷却し、同温下 1-メチルピロール-2-カルボキシアリデヒド 21 (3.27 g, 30.0 mmol) の無水酢酸 (10 ml) 溶液を滴下し、同温で 5 時間攪拌した。その後析出した固体をろ取り、ニトロ体 22 (860 mg, 19%) を得た。ろ液の溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシルカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (4:1, v/v) 溶出部より更に 22 (650 mg, 14%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.00 (3H, s), 7.40 (1H, d, J=2.0 Hz),
7.65 (1H, d, J=2.0 Hz), 9.61 (1H, s);

IR (KBr) ν: 1678, 1535, 1508, 1423, 1406,
1311, 1100, 864, 814, 770, 754 cm⁻¹

(2) Py-L-CO₂Et (23)

ホスホノ酢酸トリエチル (0.39 ml, 2.0 mmol) の THF (15 ml) 溶液に氷冷下 60% 水素化ナトリウム (83 mg, 2.1 mmol) を加え 10 分間攪拌した。同温下ニトロ体 22 (200 mg, 1.3 mmol) の THF (5 ml) 溶液を滴下し、さらに 45 分同温で攪拌した。反応溶液中に水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシルカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (1:4, v/v) 溶出部よりエステル 23 (225 mg, 77%) を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.28(3H, t, $J=7.5\text{Hz}$), 3.75(3H, s),
4.24(2H, q, $J=7.5\text{Hz}$), 6.28(1H, d, $J=16.0\text{Hz}$), 7.09(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$),
7.47(1H, d, $J=16.0\text{Hz}$), 7.54(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$);
 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 14.3, 35.4, 60.8, 106.1,
111.8, 125.3, 129.8, 130.1,
136.7, 166.5;
IR (KBr) ν : 1709, 1632, 1510, 1427, 1412,
1373, 1315, 1282, 1176 cm^{-1}

(3) Py-Py-L-CO₂Et (24)

エステル23 (1.12 g, 5.0 mmol) のメタノール溶液 (45 ml) に室温下10%パラジウム炭素 (250 mg) を加えた。この混合物に1N-水素化ホウ素ナトリウム (8 ml) を同温下に加え、さらに10分攪拌した。アセトン (2 ml) を加えた後、この懸濁液をセライトに通して沈殿物を除去した。ろ液の溶媒を減圧下留去し、得られた残留物に酢酸エチルを加えた。飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物を塩化メチレン (45 ml) に溶解し、さらなる反応に用いた。この溶液に1-メチル-4-ニトロ-2-トリクロロアセチルピロール (2.35 g, 7.0 mmol) とN,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.31 ml, 7.5 mmol) を順次室温に加え、同温下3時間攪拌した。その後、反応溶液中に水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシルカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル溶出部よりビスピロール24 (483 mg, 28%) を得た。

^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ : 1.23(3H, t, $J=7.0\text{Hz}$),
3.59(3H, s), 3.94(3H, s), 4.14(2H, q, $J=7.0\text{Hz}$), 6.01(1H, d, $J=15.5\text{Hz}$),
6.57(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 7.27(1H, br s), 7.45(1H, d, $J=15.5\text{Hz}$),
7.46(1H, d, $J=1.5\text{Hz}$), 7.50(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 9.59(1H, br s)

(4) Py-Py-Py-L-CO₂Et (26)

ビスピロール24 (173 mg、0.50 mmol) のメタノール-酢酸エチル (10 ml - 10 ml) の懸濁液に室温下10%パラジウム炭素 (50 mg) を加えた。この混合物に1N水素化ホウ素ナトリウム (1.5 ml) を同温下加え、さらに2分攪拌した。この懸濁液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに通して沈殿物を除去した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をDMF (10 ml) に溶解しさらなる反応に用いた。この溶液に4-アセトアミノ-1-メチルピロール-2-カルボン酸のHOBtエステル25 (Z.-F. Tao, et al., J. Am. Chem. Soc., 121, 4961-4967 (1999)) (209 mg、0.70 mmol) とDMAc (85 mg、0.70 mmol) を順次室温で加え、同温下3時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。メタノール-酢酸エチル (1:9, v/v) 溶出部よりトリスピロール26 (120 mg、50%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.29 (3H, t, J=7.0 Hz), 2.06 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.20 (2H, q, J=7.0 Hz), 5.99 (1H, d, J=15.5 Hz), 6.51 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.61 (1H, s), 6.94 (1H, d, J=2.0 Hz), 7.13 (1H, s), 7.32 (1H, d, J=2.0 Hz), 7.47 (1H, d, J=15.5 Hz), 7.78 (1H, s), 7.98 (1H, s), 8.36 (1H, s)

(5) Py-Py-Py-L-CO₂Im (27)

トリスピロール26 (24 mg、0.050 mmol) のメタノール-THF (10 ml - 10 ml) の溶液に室温下1N水酸化ナトリウム水溶液 (1.5) を加え室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、得られた残留物に10%酢酸水溶液を加え、生じた沈殿物をろ取し、加水分解体 (13.5 mg) を得た。この加水分解体はさらなる精製を行わずに次の反応に用いた。加水分解体 (12.8 mg) のDMF (1.5 ml) 溶液にCDI (24.3 mg、0.15 mmol) を室温で加え、同温下一晩攪拌した。その後水を加え、生じた沈殿物をろ取してイミダゾールエステル27 (13.5 mg、54%) を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 1.96 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.82 (3H, s),

3.85 (3H, s), 6.85 (1H, s), 7.08 (1H, s), 7.09 (1H, s),
 7.12 (1H, d, J=15.0Hz), 7.14 (1H, s), 7.22 (1H, s), 7.24 (1H, s),
 7.47 (1H, s), 7.87 (1H, d, J=15.0Hz), 7.90 (1H, s), 8.66 (1H, s),
 9.80 (1H, s), 9.89 (1H, s), 10.03 (1H, s)

(6) Py-Py-Py-L-DU86 (11)

DU86のA部28 (S. Nagamura, et al., J. Med. Chem., 40, 972-979 (1999)) (6.2 mg, 0.024 mmol) のDMF (2 ml) 溶液に氷冷下60%水素化ナトリウム (2.0 mg, 0.050 mmol) を加え、同温で10分攪拌した。その後、同温下イミダゾールエステル27 (12.9 mg, 0.026 mmol) のDMF (1 ml) 溶液を加え、同温でさらに5時間攪拌した。リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.86) を加えた後、水を加え、塩化メチレンで抽出した。その後、溶媒を減圧下留去し、得られた残留物をシルカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。メタノール-クロロホルム (1:9, v/v) 溶出部よりPy-Py-Py-L-DU86 11 (7.7 mg, 46%) を得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 1.29-1.31 (1H, m), 1.97 (3H, s),
 2.07-2.11 (1H, m), 2.47 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.82 (3H, s),
 3.83 (3H, s), 4.17-4.22 (1H, m), 4.27-4.32 (1H, m),
 6.57 (1H, d, J=15.0Hz), 6.83-6.85 (br s), 6.86 (1H, s), 6.90 (1H, s),
 7.06 (1H, s), 7.15 (1H, s), 7.24 (1H, s), 7.39 (1H, s),
 7.57 (1H, d, J=15.0Hz), 9.80 (1H, s), 9.89 (1H, s), 9.94 (1H, s),
 12.36 (1H, s)

産業上の利用可能性

本発明は、簡便な方法により特定の細胞に対して特異的に作用する物質を短時間でかつ高感度で、しかも安価な手段によりスクリーニングできる方法及びそのためのキット及びプレートを提供するものである。本発明の方法によれば、患者の細胞、例えば癌細胞に特異的に作用する薬物を短時間で簡便に知ることができ、

患者の癌細胞に応じたテイラーメイドの治療薬を創出することができ、患者に対してより副作用が少なく、かつ効力の大きな治療薬を提供することができる。

また、本発明の方法によれば、DNAやRNAに作用する物質を簡便に、高感度でかつ安価にスクリーニングすることができる。また、DNAやRNAに対する作用が既知の物質におけるDNAやRNAにおける作用部位を本発明の方法により簡便に知ることも可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 一般式 (I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種を用いて、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する方法。

2. 多数のウェルを有するプレート中の各ウェルにDNA又はRNAの塩基配列を認識することができる一般式 (I) で表される化合物を存在させ、当該プレートの各ウェルにDNA又はRNAを含有する物質を導入し、一般式 (I) で表される化合物とDNA又はRNAを含有する物質とを十分に作用させた後、DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定することからなるDNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定する請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 各ウェルに存在させる一般式 (I) で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの異なる塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が同じ物質である請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 各ウェルに存在させる一般式 (I) で表される化合物が、DNA又はRNAを含有する物質のDNA又はRNAの特定の1種類の塩基配列を認識することができるものであり、各ウェルに導入されるDNA又はRNAを含有する物質が異なる物質である請求の範囲第2項に記載の方法。

5. ウェルに一般式 (I) で表される化合物が固定化されている請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の方法。

6. DNA又はRNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造が、DNA又はRNAを含有する物質の天然のDNA又はRNAの連続する少なくとも2塩基を認識するものである請求の範囲第1項～第5項の

いずれかに記載の方法。

7. DNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造が、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造である請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の方法。

8. 置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造が、主鎖上又は主鎖に懸垂されている請求の範囲第7項に記載の方法。

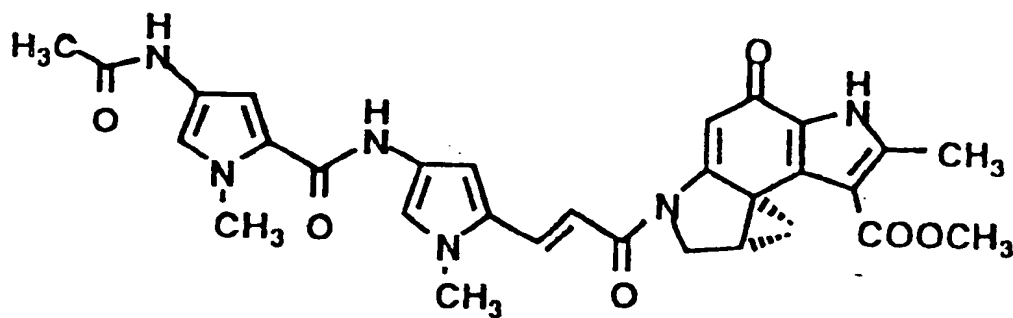
9. DNAとの相互作用を有する化学構造を有するAが、抗癌剤の化学構造である請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の方法。

10. 抗癌剤が、アルキル化剤である請求の範囲第9項に記載の方法。

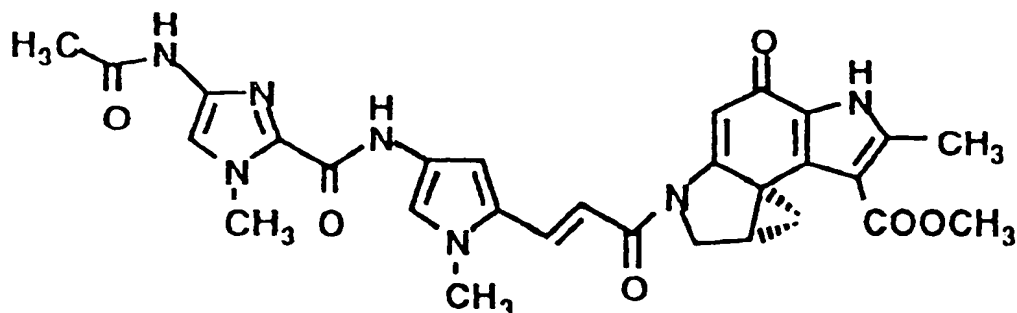
11. アルキル化剤が、シクロプロパン環を有する化学構造である請求の範囲第10項に記載の方法。

12. A及びBの化学構造を結合させ得るリンカーが、ビニル基を含有する化学構造である請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の方法。

13. 一般式(I)で表される化合物が次式



又は



で表される化合物である請求の範囲第7項～第12項のいずれかに記載の方法。

14. DNA又はRNAを含有する物質が、細胞である請求の範囲第1項～第13項のいずれかに記載の方法。

15. 細胞が、癌細胞である請求の範囲第14項に記載の方法。

16. DNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段が、物質の生死を判定する方法である請求の範囲第2項～第15項のいずれかに記載の方法。

17. 物質の生死を判定する方法が、物質の着色によるものである請求の範囲第16項に記載の方法。

18. 請求の範囲第1項～第17項のいずれかに記載の方法を行うための、DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定用のキット。

19. 一般式(I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種、及び作用後のDNA又はRNAを含有する物質の状態を測定する手段のための器具又は試薬からなる請求の範囲第18項に記載のキット。

20. 複数のウェルを有するプレート中の各ウェルに、一般式(I)、

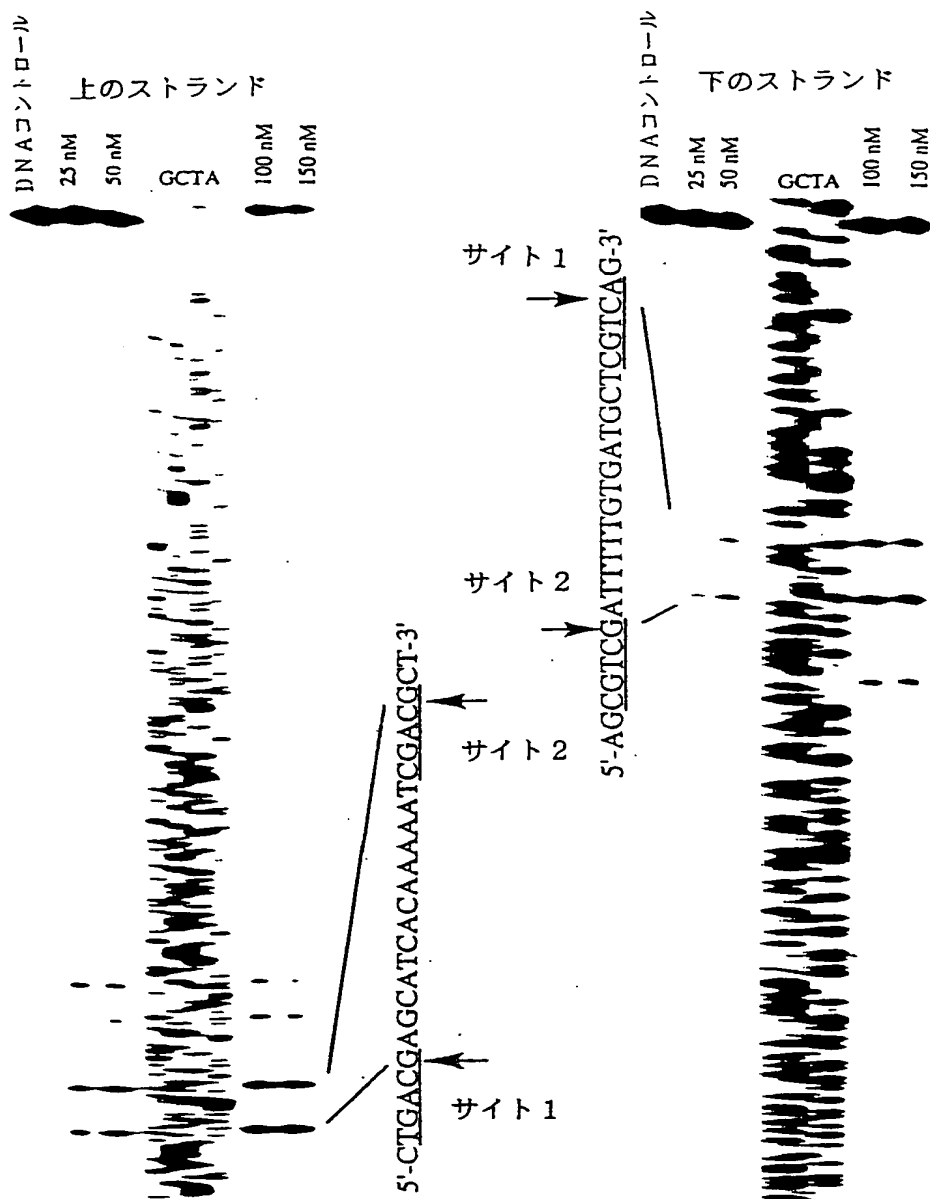
B - L - A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識することができる非天然型の塩基を含有する化学構造を示し、AはDNAとの相互作用を有する化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。)

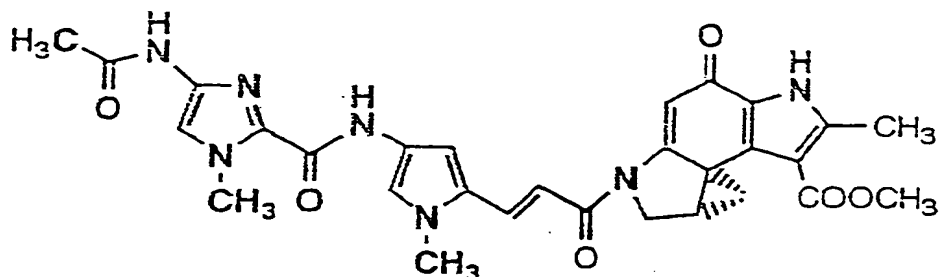
で表されるDNAの塩基配列を認識し得る化学種が存在してなる複数のウェルを有するプレート。

21. DNA又はRNAを含有する物質に対する化学種Aの作用を検出または同定するためのプレートである請求の範囲第20項に記載のプレート。

第 1 図



第 2 図



5'- AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA
3'- TCTTAGTCCC CTATTGCGTC CTTTCTTGTA CACTCGTTTT CCGGTCGTTT

AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC
TCCGGTCCTT GGCATTTTTTC CGGCGCAACG ACCGCAAAAAA GGTATCCGAG

サイト1 ↓ サイト2 ↓
 CGCCCCCTG **AC**GAGCATCA CAAAAATCGA **CG**CTCAAGTC AGAGGTGGCG
 GCGGGGGGAC **TG**CTCGTAGT GTTTTTAGCT **GCG**AGTTCAG TCTCCACCGC

AAACCCGACA GGACTATATAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC
TTTGGGCTGT CCTGATATTT CTATGGTCCG CAAAGGGGGA CCTTCGAGGG

TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
AGCACGCGAG AGGACAAGGC TGGGACGGCG AATGGCCTAT GGACAGGCGG

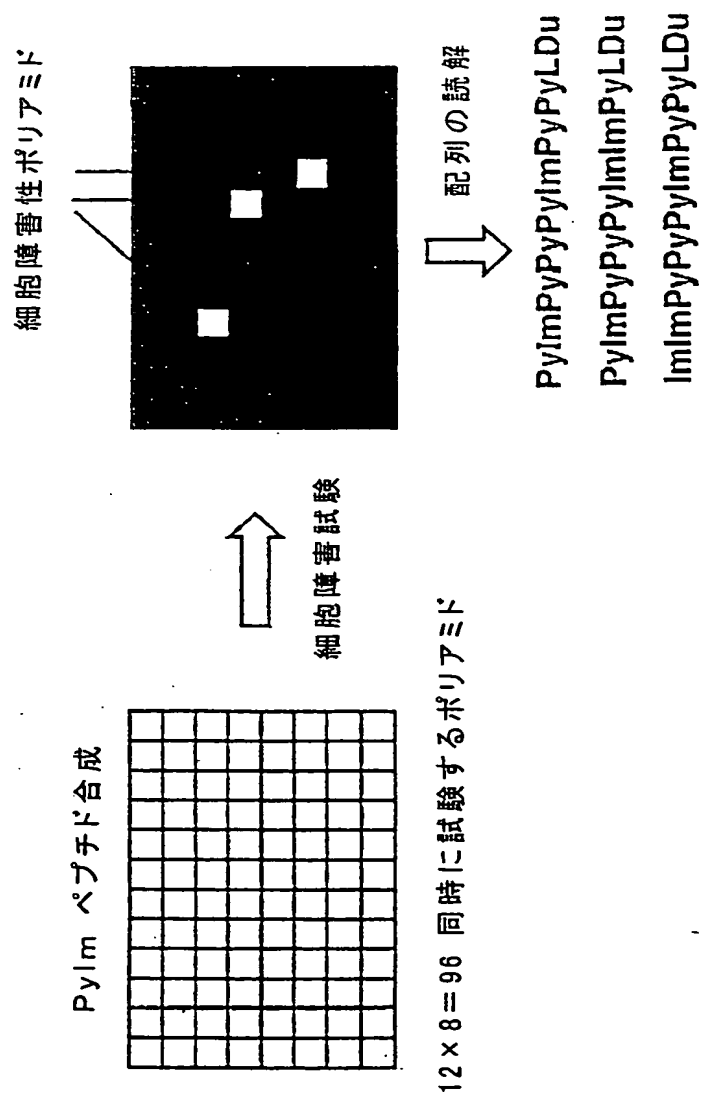
TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA
AAAGAGGGAA GCCCTTAGCA CCGCGAAAGA GTTACGAGTG CGACATCCAT

TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC
AGACTCAAGC CACATCCAGC AAGCGAGGTT CGACCCGACA CACGTGCTTG

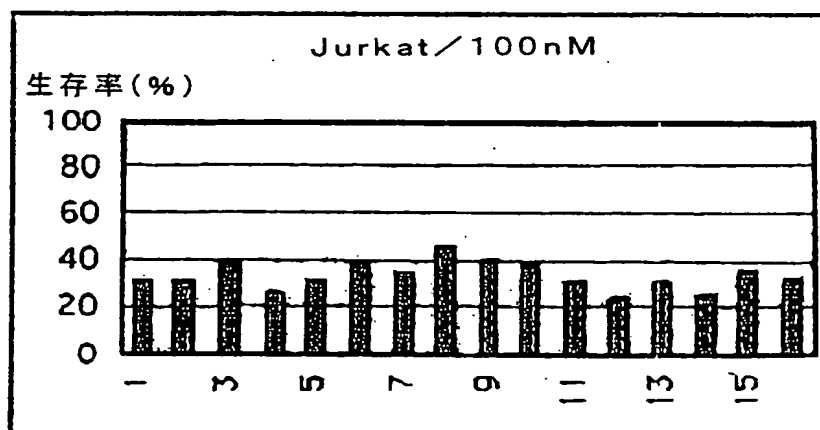
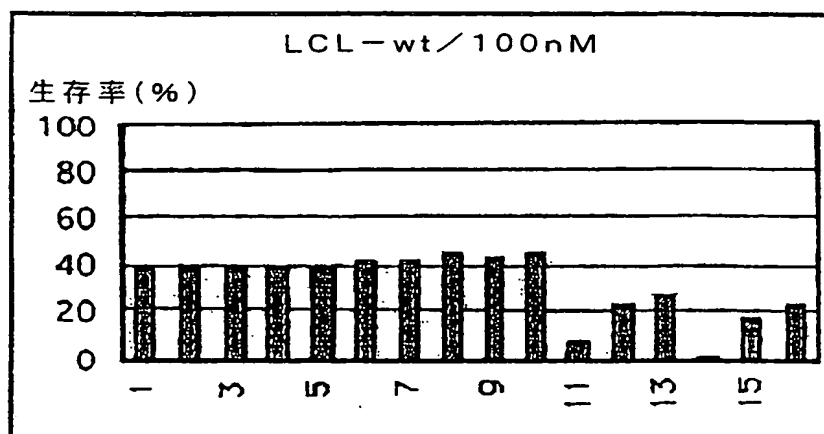
CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAAC TA TCGTCTTGAG
GGGGGCAAGT CGGGCTGGCG ACGCGGAATA GGCCATTGAT AGCAGAACTC

TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA-3'
AGGTTGGGCC ATTCTGTGCT GAATAGCGGT GACCGTCGTC GGTGACCATT-5'

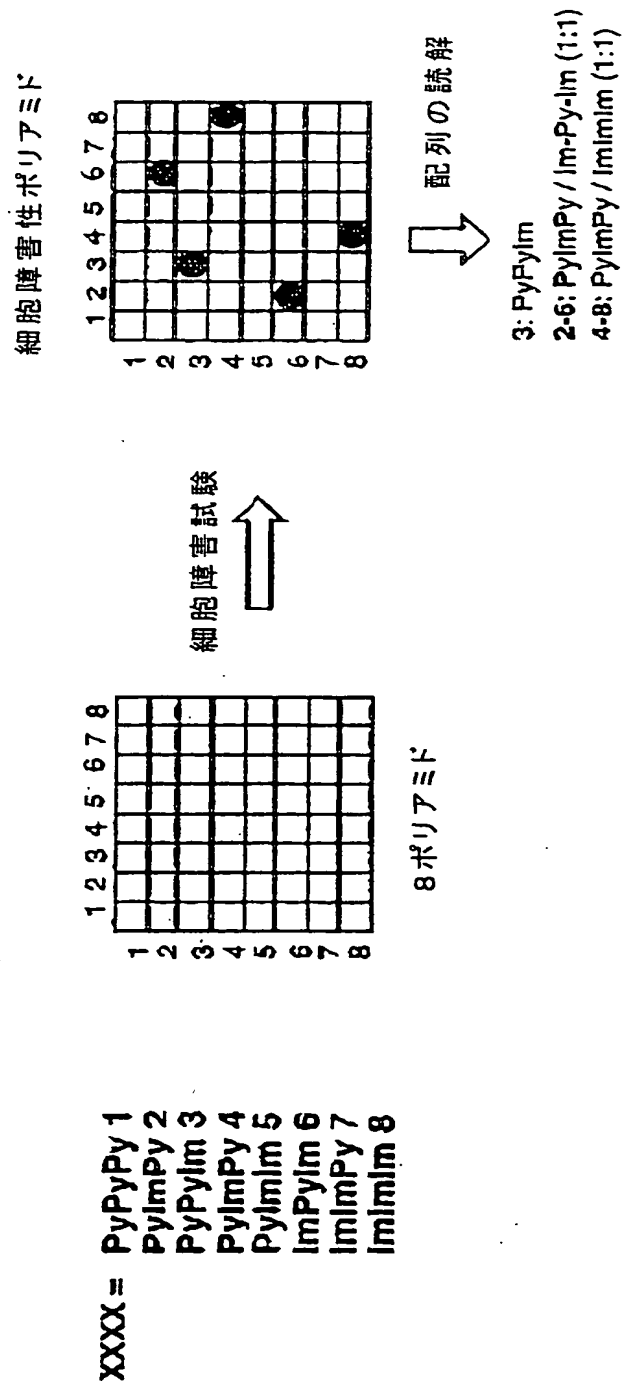
第 3 図



第 4 図



第 5 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12Q1/02, C12Q1/04, C12N15/09, G01N33/566, G01N33/53, G01N33/15//C07D487/04, A61K31/4178, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-1/04, C12N15/00-15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)
REGISTRY (STN)
BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 2000/58312, A1 (KAGAKU GIJYUTSU SHINKO JIGYODAN), 05 October, 2000 (05.10.00) & JP, 2000-281679, A	1-21
A	The Chemical Society of Japan (CSJ) ed., "Lecture proceedings II of the 74 th Spring Annual Meeting, the Chemical Society of Japan (CSJ), " (14 March, 1998) 3G309	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 February, 2001 (05.02.01)

Date of mailing of the international search report
13 February, 2001 (13.02.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12Q1/02, C12Q1/04, C12N15/09, G01N33/56
6, G01N33/53, G01N33/15//C07D487/04, A61K31/4178, A
61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00~1/04, C12N15/00~15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)
REGISTRY (STN)
BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 2000/58312, A1 (KAGAKU GIJYUTSU SHINKO JIG YODAN) 05. 10月. 2000 (05. 10. 00) & JP, 2 000-281679, A	1-21
A	社団法人日本化学会発行「日本化学会第74春季年会講演予稿集I I」(1998年3月14日) 3G309	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 02. 01

国際調査報告の発送日

13.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

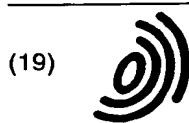
鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 152 061 A1**

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:
07.11.2001 Bulletin 2001/45

(21) Application number: 00974961.5

(22) Date of filing: 13.11.2000

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/68**, C12Q 1/02,
C12Q 1/04, C12N 15/09,
G01N 33/566, G01N 33/53,
G01N 33/15
// (C07D487/04, A61K31:4178,
A61P35:00)

(86) International application number:
PCT/JP00/07992

(87) International publication number:
WO 01/36677 (25.05.2001 Gazette 2001/21)

(84) Designated Contracting States:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**

(30) Priority: 16.11.1999 JP 32600799

(71) Applicant: **Japan Science and Technology
Corporation**
Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 (JP)

(72) Inventors:
• **SUGIYAMA, Hiroshi**
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0081 (JP)

• **SAITO, Isao**
Kyoto-shi, Kyoto 607-8242 (JP)
• **IIDA, Hirokazu**
Bunkyo-ku, Tokyo 112-0002 (JP)

(74) Representative: **Cresswell, Thomas Anthony et al**
J.A. KEMP & CO.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ (GB)

(54) **DEVELOPMENT OF METHOD FOR SCREENING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PYRROLE
IMIDAZOLE DERIVATIVE**

(57) A method for screening the effect of a segment A (chemical species A) on a substance (for example, a cell) containing DNA or RNA by using artificial chemical species. Namely, a method of detecting or identifying the function of a chemical species A on a substance containing DNA or RNA by using one or more chemical species represented by the following general formula (I)

which are capable of recognizing a DNA base sequence; a kit therefor; and a plate to be used therein: B-L-A (I) wherein B represents a chemical structure containing an non-natural base capable of recognizing a DNA base sequence; A represents a chemical structure having an interaction with DNA; and L represents a linker whereby the chemical structures A and B can be linked together.

EP 1 152 061 A1

DescriptionTechnical Field

5 [0001] The present invention relates to a method for detecting or identifying an action for substances containing DNA or RNA such as cells, using a chemical species having a chemical structure containing non-natural base which can recognize base sequences of natural DNA or RNA, a kit therefor and a plate to be used therefor.

Background Art

10 [0002] As a result of studies conducted by the human genome project, base sequences of the full set of genes, "a draft of the human life", will be elucidated within a few years. It is known that diseases or senescence will be developed if the draft has a defect or is injured. As the results of development of the human genome project, many diseases including cancer can be elucidated in a DNA level, and the total medical sciences consisting mainly of diagnosis and prevention are believed to be changed revolutionarily. Further, although we have a great expectation for developments of a therapeutic method based on understanding in DNA levels of diseases and pharmaceuticals targeting in causal genes of the diseases or their products, studies of such fundamental researches mediating to clinical studies have just started. Antitumor drugs used at present are mainly antibiotics selected by screening works, and originally are not the product produced by microorganisms for the purpose of killing tumor cells. Furthermore few drug based on the molecular biological knowledge on tumor has been known. If an expression of an intracellular specific gene can be freely controlled extracellularly, an ultimate therapeutic method in a gene level can be achieved.

15 [0003] We, recently, found that an antibiotic duocarmycin could construct a heterodimer with other kinds of molecules such as distamycin to perform cooperatively molecular recognition of DNA and also perform efficiently an alkylation to a base sequence different from the case of duocarmycin alone (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14405, 1996). Based on the results of this study, we succeeded to synthesize a molecule which could selectively alkylate DNA at any position of its base sequence, by binding pyrrole-imidazole polyamide as a recognition site for DNA to the active alkylation site of duocarmycin, and applied a patent (JP-A-10-260710).

20 [0004] However, the compounds, in which the pyrrole-imidazole polyamide as a DNA recognition site is bound only in the active alkylation site of duocarmycin, are not only insufficient in the alkylation activity but also able only to recognize a single-stranded base sequence. Consequently, we examined alkylation mechanisms between these molecules and DNA in detail using a computer modeling such as molecular dynamics of these compounds, and found that double-stranded DNA could be simultaneously alkylated and cleaved by introducing a linker such as vinyl group into the cyclopropane moiety (segment A), an active site of duocarmycin (JP-A-11-83591).

25 [0005] From the fact that these artificial chemical species, which could recognize base sequences of natural DNA and RNA, recognized a specific base sequence of the natural DNA and RNA, and affected an action of the segment A to the specific site of the DNA and RNA, we found that these artificial chemical species could be applied in place of a partial sequence of the natural DNA and RNA.

Disclosure of the Invention

30 [0006] An aspect of the present invention is to provide a method for screening an action of the segment A (chemical species A) to substances containing DNA or RNA such as cells by using these artificial chemical species.

35 [0007] The present invention relates to a method for detecting or identifying an action of chemical species A to substance containing DNA or RNA comprising using the chemical species, which can recognize a base sequence of the DNA, represented by the general formula (I):



40 wherein B is a chemical structure containing non-natural base which can recognize the base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B.

45 [0008] More particularly, the present invention relates to a method for detecting or identifying an action of chemical species A to a substance containing DNA or RNA comprising providing the compound represented by the general formula (I), which can recognize a base sequence of DNA or RNA in each well of a plate consisting of a plurality of wells, introducing a substance containing DNA or RNA into each well of said plate, reacting completely with the compound represented by the general formula (I) and the substance containing DNA or RNA, and assaying a state of the substance containing DNA or RNA.

[0009] More further particularly, in the method described hereinabove, the present invention relates to a method according to the method described hereinabove wherein the compound represented by the general formula (I) in each well is the compound which can recognize a difference in the base sequence of DNA or RNA of the substance containing DNA or RNA and the substance containing DNA or RNA which is introduced into each well is the same substance.

[0010] Further, in the method described hereinabove, the present invention relates to a method according to the method described hereinbefore wherein the compound represented by the general formula (I) in each well is the compound which can recognize a specific type of the base sequence of DNA or RNA of the substance containing DNA or RNA and the substance containing DNA or RNA which is introduced into each well is a different substance.

[0011] Further, the present invention relates to a kit for detection or identification of an action of the chemical species A to a substance containing DNA or RNA for carrying out the various methods described hereinbefore.

[0012] More particularly, the present invention relates to a kit for detecting or identifying an action of the chemical species A to a substance containing DNA or RNA comprising consisting of the chemical species which can recognize a base sequence of the DNA, represented by the general formula (I):



wherein B is a chemical structure containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together the chemical structures of A and B; and equipment or reagents for assaying a state of the substance containing DNA or RNA after treatment.

[0013] Further, the present invention relates to a plate consisting of a plurality of wells comprising presence of a chemical species which can recognize a base sequence of DNA, represented by the general formula (I):



wherein B is a chemical structure containing a non-natural base which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B;

in each well in the plate consisting of a plurality of wells, and relates to a plate comprising a plate for detecting or identifying an action of a chemical species A for a substance containing DNA or RNA.

Brief Description of the Drawings

[0014]

Fig.1 is a photograph instead of a drawing which shows a result of reaction with ImPyLDu86 of the present invention and DNA

Fig.2 shows a base sequence of DNA and a chemical structure of ImPyLDu86 used in the experiment in Fig. 1.

Fig.3 shows a method for screening antitumor agents specific to tumor cells using the plate of the present invention.

Fig.4 shows survival rates of tumor cells in the concentrations at 100 nM of the compounds 1 - 16 of the present invention.

Fig.5 illustrates a method for testing simultaneously a case using the compounds of the present invention alone and a case using mixture thereof.

Best Mode for Carrying Out the Invention

[0015] The chemical structure B containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA in the general formula (I) hereinbefore of the present invention is preferably the chemical structure derived from pyrrole and/or imidazole which may optionally have substituents. Examples of the substituents of pyrrole and imidazole are not limited so long as they do not hinder a recognition of a base sequence of DNA, and are straight or branched alkyl group having 1-10 carbon atoms, preferably 1-5 carbon atoms including, for example, alkoxy group derived from said alkyl group, hydroxyl group, amino group, N-alkyl-substituted amino group derived from said alkyl group, N-acylamino group derived from organic carboxylic acids, guanidino and substituted guanidine groups. More specifically, N-methylpyrrole, N-methylimidazole, 3-hydroxypyrrole, N-methyl-3-hydroxypyrrole, and the like are included.

[0016] These non-natural bases which can recognize a natural base sequence may optionally be located in a main chain or may optionally be pendent from a main chain. When these non-natural bases are located in a main chain, these non-natural bases per se may have functional groups for constructing the main chain, for example, a carboxyl

group in an end and an amino group in the other end of the non-natural base, and these bases may construct a polyamide structure. The structure constructing the main chain may not be limited within the above polyamide structure, and can be a structure which constructs polyester structure, polyimine structure, and the like.

[0017] When these non-natural bases are pendent from a main chain, these bases may be pendent from a structure of polysaccharide such as natural DNA or RNA, or may be pendent from a structure of a synthetic polymer.

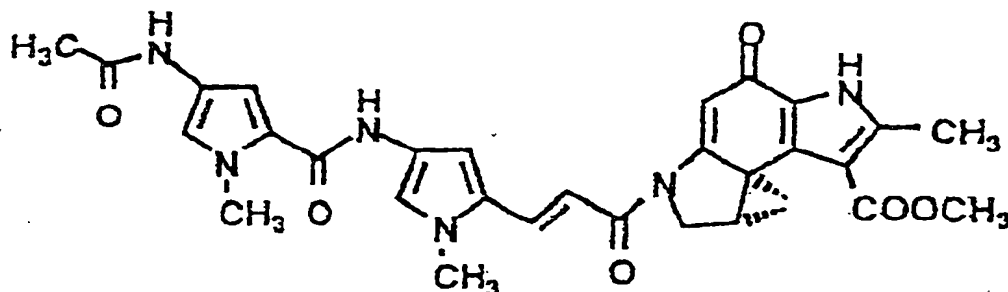
[0018] Preferable example of the chemical structure B containing non-natural bases, which can recognize a base sequence of DNA, is, more specifically, a pyrrole-imidazole polyamide linkage. Numbers (lengths) of pyrrole and imidazole are not limited, and are preferably about 2-30 units, more preferably about 24-16 units, and further more preferably about 4-16 units.

[0019] The chemical structure A, which can bind with a base in DNA, can be a variety of chemical species so long as they can interact with DNA or RNA. Example of the preferable structure of the chemical species (segment A) is a structure of chemical substance having an antitumor activity. Example of a chemical substance having an antitumor activity is preferably alkylating agent for acting to DNA. More preferably, it is a chemical structure having a cyclopropane ring, and further more preferably alkylating moiety of duocarmycin.

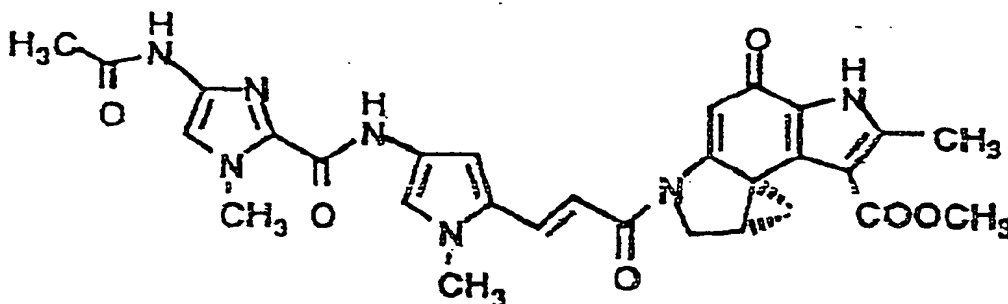
[0020] The linker moiety L which can bind with the chemical structures A and B may preferably be a structure which can separate the segment A and the segment B with a suitable distance as well as does not inactivate the alkylating activity. Preferable example is a chemical structure having a vinyl group.

[0021] The compound represented by the general formula (I) can be used alone or as a mixture of two or more of these compounds. When two or more compounds represented by the general formula (I) are used as a mixture, there may be various mixing patterns. Generally, a mixture of chemical species having different chemical species B (segment B) from each other may be preferable, but is not limited within the same.

[0022] Examples of a preferable compound of the present invention represented by the general formula (I) are the compound represented by the following formula (hereinafter designated as "PyPyLDu86"):

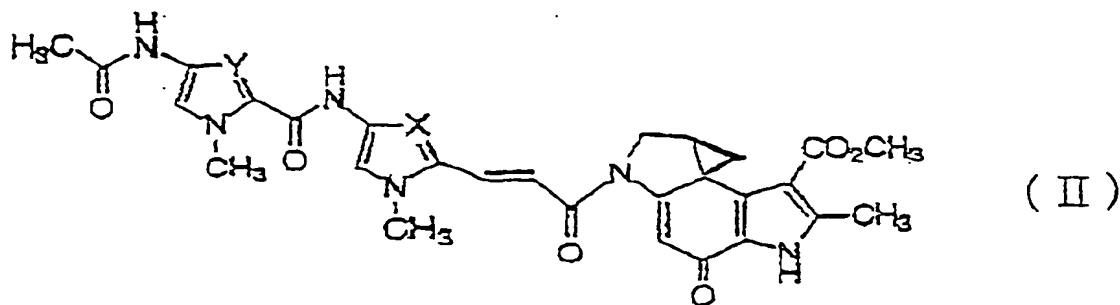


or the compound represented by the following formula (hereinafter designated as "ImPyLDu86"):



[0023] The compounds described hereinabove can recognize sequences such as a base sequence TGACG, or a complementary strand thereof corresponding to ImPyLDu86.

[0024] Further, a compound represented by the general formula (II) having a structure of {Py or Im}{Py or Im}Ldu86 of the following formula, which is constructed with a basic structure PyPyLDu86:

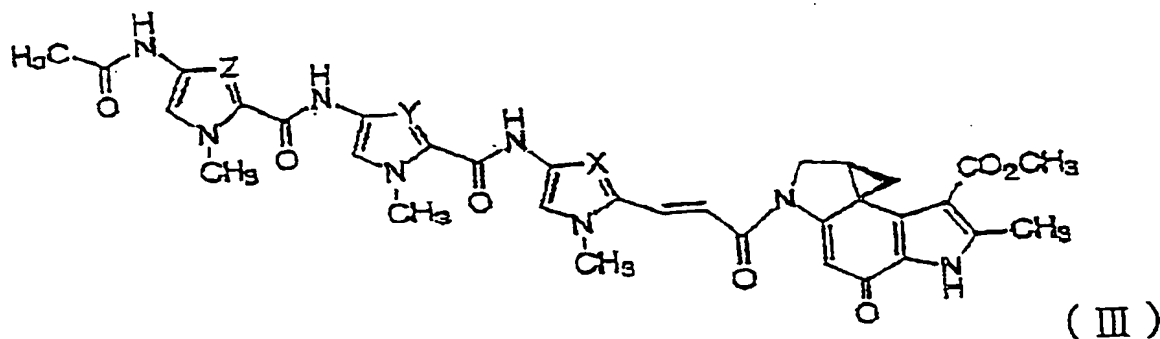


15 wherein X and Y are, each independently, -CH= or -N=,
or a mixture thereof in the ratio of 1 : 1 is included.

[0025] For the explanations hereinbelow, these compounds or mixtures thereof are numbered as follows.

20 A compound wherein X is CH and Y is CH is designated as compound 1;
a compound wherein X is CH and Y is N is designated as compound 2;
a compound wherein X is N and Y is CH is designated as compound 3;
a compound wherein X is N and Y is N is designated as compound 4;
a mixture of the compound 1 and the compound 2 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 5;
a mixture of the compound 1 and the compound 3 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 6;
a mixture of the compound 1 and the compound 4 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 7;
25 a mixture of the compound 2 and the compound 3 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 8;
a mixture of the compound 2 and the compound 4 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 9; and
a mixture of the compound 3 and the compound 4 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 10.

30 [0026] Further, a compound represented by the general formula (III) having a structure of {Py or Im}{Py or Im}{Py or Im}Ldu86 of the following formula, which is constructed with a basic structure PyPyPyLdu86:



45 wherein X, Y and Z are, each independently, -CH= or -N=,
or a mixture thereof in the ratio of 1 : 1 can be included.

[0027] For the explanations hereinbelow, these compounds or mixtures thereof are numbered as follows.

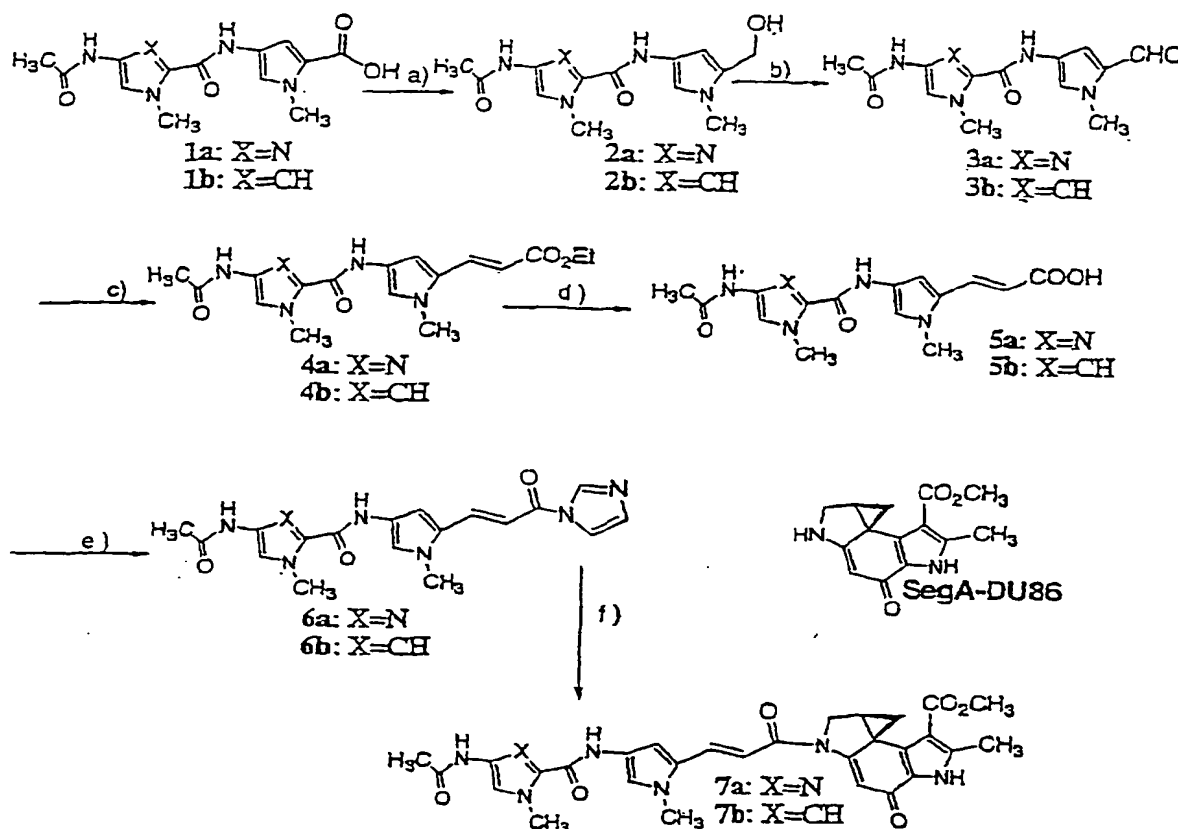
50 A compound wherein X is CH, Y is N and Z is N is designated as compound 11;
a compound wherein X is CH, Y is N and Z is CH is designated as compound 12;
a compound wherein X is CH, Y is CH and Z is CH is designated as compound 13;
a mixture of the compound 11 and the compound 12 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 14;
a mixture of the compound 11 and the compound 13 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 15; and
55 a mixture of the compound 12 and the compound 13 in the ratio of 1 : 1 is designated as compound 16.

[0028] These compounds 1-16 are used in the experiments described hereinbelow.

[0029] The compound represented by the general formula (I) can be produced according to the known methods.

Namely, the compound can be produced by producing the segment A and the segment B by the conventional methods; binding the linker segment L successively therewith; and then further binding the remaining segments therewith.

[0030] For example, examples of the processes for producing ImPyLDu86 (7a) and PyPyLDu86 (7b) described hereinbefore are illustrated in the following chemical reaction scheme. Numbers below each compound in the reaction scheme show the numbers of those compound.



[0031] In the reaction scheme; a) indicates treatment with a solution of benzotriazole-1-yl-oxytris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) in THF, followed by NaBH_4 treatment; b) indicates treatment with MnO_2 in THF; c) indicates treatment with triethylphosphonoacetate and NaH in THF; d) indicates treatment with sodium hydroxide in aqueous methanol; e) indicates treatment with 1,1-carbonyl-di-imidazole in DMF; and f) indicates treatment of Du86 with the segment A using sodium hydride in DMF.

[0032] Reactivities of thus synthesized PyPyLDu86 and ImPyLDu86 with DNA were determined. Results of alkylation by ImPyLDu86 is shown in Fig.1. DNA and ImPyLDu86 used in the present experiment are shown in Fig.2.

[0033] In Fig.1, the left migration pattern shows a result of the upper strand of the double-stranded DNA, and the right migration pattern shows a result of the lower strand of the double-stranded DNA. Locations of alkylation can be observed as cleavage bands by heating. As a result, the double-stranded DNA was cleaved mainly at the site 1 and the site 2 from a low concentration, and it was understood that the alkylation occurred simultaneously in the double-stranded DNA. No compound to generate such a cleavage has been known until now, and it can be surely regarded as an artificial restriction enzyme. Moreover, it was found that the cleavage occurred in such a high ratio as 70%, showing a very high efficiency in comparison with the previously synthesized compounds (JP-A-10-260710).

[0034] As for an example of a substance containing DNA or RNA, it is preferable to use living cells although DNA or RNA per se can be used. When an antitumor agent is used as the segment A, tumor cells can be used.

[0035] In a case when methylpyrrole (Py) and methylimidazole (Im) are used as non-natural bases in the segment B in the general formula (I), since it is known that a C-G base pair is recognized by Py-Im; a G-C base pair is recognized by Im-Py; and a A-T or a T-A base pair is recognized by Py-Py, an objective base sequence can be recognized by appropriately combining methylpyrrole (Py) and methylimidazole (Im). Namely, a sequence of natural three bases can be recognized by using three units (trimer) of methylpyrrole (Py) and methylimidazole (Im), and a sequence of natural

four bases can be recognized by using four units (tetramer) of methylpyrrole (Py) and methylimidazole (Im).

[0036] Furthermore, a compound having a sequence of the segment B can be used as a mixture of two or more kinds of them.

[0037] In the method of the present invention, an action of the chemical species A to a substance containing DNA or RNA can be detected or identified by assaying a state of the substance containing DNA or RNA, after reacting completely the compound represented by the general formula (I) with a substance containing DNA or RNA.

[0038] As a mean for reacting completely the compound represented by the general formula (I) with a substance containing DNA or RNA, the reaction can be performed by incubating both in a suitable buffer. As a mean for assaying a state of a substance containing DNA or RNA after the incubation, various labeling or coloring methods can be used. These means can be suitably selected depending on a state of a substance containing DNA or RNA.

[0039] When living cells are used as a substance containing DNA or RNA, and their state is detected by their survivals, a method for coloring cells is simple and preferable. Quantification of numbers of living cells can be achieved by using commercially available cell counting kit or by combining the kit with a light absorbance in the coloring.

[0040] Embodiments of use of the present invention will be explained concretely in the following.

[0041] Fig.3 illustrates a method of the present invention. The left figure in Fig.3 shown like a section paper is a plate consisting of a plurality of wells, and each square indicates each well. In this example, a plate with 96 wells is illustrated. In each well, the chemical species represented by the general formula (I) hereinbefore of the present invention are present. Firstly, a case will be explained wherein the chemical species represented by the general formula (I) of the present invention in each well recognizes different base sequence from each other.

[0042] In the case of a tetramer, for example, non-natural bases consisting of methylpyrrole (Py) and methylimidazole (Im) are used in the moiety of the segment B in the chemical species represented by the general formula (I), and a set of bases, which can recognize different three bases, can be prepared by using the structures of all permutations and combinations consisting of Py and Im such as Py-Py-Py-Py, Py-Py-Py-Im, Py-Py-Im-Py and Im-Im-Im-Py (in this case, 16 varieties of combinations can be obtained). An alkylating agent is bound to the segment A of the general formula (I), then the resulting compound is linked with the linker L containing vinyl group.

[0043] Then, sixteen types of chemical species having different structures in the segment B are added into each well of the plate shown in the left figure in Fig.3. Subsequently, tumor cells are added to each well, and incubated for several hours to several days. As a result, the chemical species represented by the general formula (I) recognize a specific region of the base sequences of the tumor cells and reacts with the DNA of tumor cells and alkylating them to kill the tumor cells. In the right figure in Fig.3, contents of each well are stained after completing the above incubation. Living cells are stained by coloring agents as shown black color in Fig.3, whereas dead cells can not be stained as shown blank (white) in Fig.3. The example shown in Fig.3 is the case in which octamer is used as the segment B, and it is shown that the cancer cells are killed in three types of non-natural base sequences. Since the non-natural base sequence present in each well is known in advance, it can be known by this test in what cases of sequences the tumor cells are killed.

[0044] In the case shown in Fig.3, an octamer is used. Consequently, the chemical species represented by the general formula (I) having 2^8 , i.e. 256 types of the segment B moieties are present in each well. In this case, it is observed that three types of sequences among them can specifically kill the tumor cells. In this case, the three sequences are found to be as follows:

PyImPyPyPyImPyPy,
PyImPyPyPyImImPy, and
ImImPyPyPyImPyPy.

[0045] Since tumor cells are different depending on their types and organisms, according to the method described hereinbefore in the present invention, antitumor agents having specific action to the tumor cells as a specimen assayed can be retrieved within a short time in a simple manner. Further, tumor cells, even in the same tissue, may be mutated depending on their stage. Even in such case, an antitumor agent specific to the mutated tumor cells can conveniently be retrieved by the method of the present invention. In addition, according to the method of the present invention described hereinbefore, an action of the antitumor agent to peripheral normal cells of the tumor tissues can also be studied by the same method.

[0046] Consequently, the method of the present invention provides a convenient screening method for an antitumor agent having a specific action to the objective tumor cells without affecting normal cells within a short time.

[0047] Then, the compounds 1-16 mentioned hereinbefore were assessed for their activities.

[0048] Cytotoxicity tests were performed using compounds consisting of 2 or 3 pyrrole (Py) and imidazole (Im) amide moieties in total. Results of effects indicated by survival rates of cells using the compounds 1-16 described hereinbefore are shown in Fig.4. Simultaneous screening tests using human tumor cells LCL-wt, HLC-2 and human leukemia cell Jurkat showed that only the compound 14 showed high cytotoxicity against LCL-wt and no useful effect was shown

against Jurkat and HLC-2.

[0049] Fig.4 shows the test results on cytotoxicities of the compounds 1-16 against LCL-wt and Jurkat at the concentration of 100 nM.

[0050] As shown above, it became obvious that mixtures of 2 or more compounds represented by the general formula (I) of the present invention showed specific activities. Cases of the test methods using these mixtures are shown in Fig.5. In Fig.5, a test using $8 \times 8 = 64$ wells are shown.

[0051] Cases with 3 recognition sites in the segment B are illustrated. When pyrrole (Py) and imidazole (Im) are used as the recognition components, combinations of 2^3 types, i.e. 8 types, can be included. These 8 types, 25 μ l each, were added to each well in the lengthwise and the breadthwise. For example, 8 types of compounds were added to each line and row of wells, respectively, in such manner as adding Py-Py-Py, 25 μ l each, on the first line and the first row of the plate, then adding Py-Im-Py, 25 μ l each, on the second line and the second row of the plate, further adding Py-Py-Im, 25 μ l each, on the third line and the third row of the plate. As a result, only one type of the compound was added in the wells on the diagonal line of the plate, and the mixtures consisting of 2 types of compounds in a ratio of 1:1 were added in the wells other than those on the diagonal line. Results of incubation with tumor cells performed by the same method as the method shown in Fig.3 and treatment with coloring agents are illustrated in Fig.5.

[0052] In the case shown in Fig.5, death of the tumor cells are observed in the well on the third line and the third row, wells on the second line and the sixth row and on the sixth line and the second row, and wells on the fourth line and the eighth row and on the eighth line and the fourth row. Since the well on the third line and the third row is on the diagonal line, Py-Py-Im alone can be found to kill the tumor cells. Since the wells on the second line and the sixth row and on the sixth line and the second row and the wells on the fourth line and the eighth row and on the eighth line and the fourth row are located in the symmetrical positions about the diagonal line, the former is a 1 : 1 mixture of Py-Im-Py and Im-Py-Im and the latter is a 1 : 1 mixture of Py-Im-Py and Im-Im-Im. In this case, it is shown that the compound or the mixtures having these segments B are specifically effective against these tumor cells.

[0053] Further, this experimental case demonstrates an important point that although an efficacy of the compound of the general formula (I) against tumor cells is not shown when the compound is used alone, there is a case showing an efficacy only when used in a mixture with other compound.

[0054] According to the test method of the present invention, results of the case using the compound represented by the general formula (I) alone can be obtained, and simultaneously results of the case using these compounds as a mixture can also be obtained.

[0055] The above case is the method for retrieving an antitumor agent specific to tumor cells. Further, a chemical species having the segment B moiety represented by the general formula (I) of the present invention corresponding to said base sequence is prepared using tumor cells, of which an efficacy is known at a specific location in the base sequence, as the substance containing DNA or RNA, a plurality of types of chemical species represented by the general formula (I) of the present invention, which are bound with various candidate compounds of an antitumor agent and different each other in their segment A moieties, are provided in each well, then these chemical species are incubated with tumor cells described hereinbefore, thus actions of the candidate compounds in the segment A moieties can be retrieved.

[0056] An aspect of the present invention is to provide a screening method for an antitumor action to tumor cells by binding the candidate compound of an antitumor agent to the segment A moiety of the general formula (I) of the present invention.

[0057] Further, the present invention provides a kit for detecting or identifying an action of the chemical species A for the substance containing DNA or RNA for performing the various methods of the present invention described hereinbefore.

[0058] More particularly, the present invention provides a kit for detecting or identifying an action of the chemical species A to the substance containing DNA or RNA comprising consisting of the chemical species, which can recognize a base sequence of DNA, represented by the general formula (I):



wherein B is a chemical structure containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B;

and equipment or reagents for assaying a state of the substance containing DNA or RNA after treatment. As described hereinbefore, the compound of the general formula (I) of the present invention may be used alone or may be prepared to be used as a mixture of 2 or more types of the compounds.

[0059] Further, the present invention provides a plate consisting of a plurality of wells comprising providing the chemical species, which can recognize a base sequence of DNA, represented by the general formula (I):

wherein B is a chemical structure containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B;

in each well in the plate consisting of a plurality of wells. More particularly, the plate of the present invention is a plate for detecting or identifying an action of the chemical species A to the substance containing DNA or RNA.

[0060] The compound represented by the general formula (I) hereinbefore may be of one type or two or more types, being immobilized in each well of the plate. These compounds may also be in a state of solution or gel.

[0061] The present invention will be explained in detail by concrete examples, but is not limited within these concrete examples.

Examples

Example 1 (Assessment of antitumor effect by cytotoxicity test)

[0062] Human tumor cells LCL-wt and HLC-2, human leukemia cell, Jurkat, and human cervix cancer cell HeLa cell were used as tumor cells. For LCL-wt and Jurkat, PRMI 1640 (Gibco BRL) + 10% fetal bovine serum (JRH BIOCIENCES) + 100 μ U/ml penicillin G - 100 μ U/ml streptomycin sulfate (Gibco BRL) were used as the medium for incubation. For HLC-2, MEM + 10% fetal bovine serum (JRH BIOCIENCES) + 100 μ U/ml penicillin G - 100 μ U/ml streptomycin sulfate (Gibco BRL) were used as the medium for incubation. For HeLa cell, RBMI + 10% fetal bovine serum (JRH BIOCIENCES) + 100 μ U/ml penicillin G - 100 μ U/ml streptomycin sulfate (Gibco BRL) were used as the medium for incubation. Respective cells were incubated and cells with the logarithmic growth phase were suspended and used for screening.

[0063] The screening was carried out as follows. Cell suspension adjusted to the initial cell counts at approximately 2×10^6 cells/ml was added separately into 96 wells of multi-plate at 50 μ l/well. The test solution of the test compound (100 μ M, medium + 0.1% DMSO) was added thereto and incubated at 37°C, under 5% CO₂ concentration, for 2 days in the incubator, then cell counts were counted.

[0064] Cell counts were calculated using a micro plate reader (MPR-A4i, TOSOH) and a hemocytometer. In an assay using the micro plate reader, the cell counting kit-8 (DOJINDO) was used, and light absorbance was measured at 450 nm (reference wave length 600 nm). Viable cell counts and inviable cell counts were performed by the dye exclusion test using trypan blue under a microscope. Based on the results of measuring using the micro plate reader and the hemocytometer, survival rate was calculated by the following formula:

$$\text{Survival rate} = 100 n_p / n_a$$

wherein n_p is the viable counts with addition of sample and n_a is the control viable counts.

Example 2 (Cytotoxicity test)

[0065] Simultaneous screening tests were performed using human tumor cells LCL-wt, HLC-2 and human leukemia cell Jurkat with the plate of the present invention using the compounds 1-16 described hereinbefore.

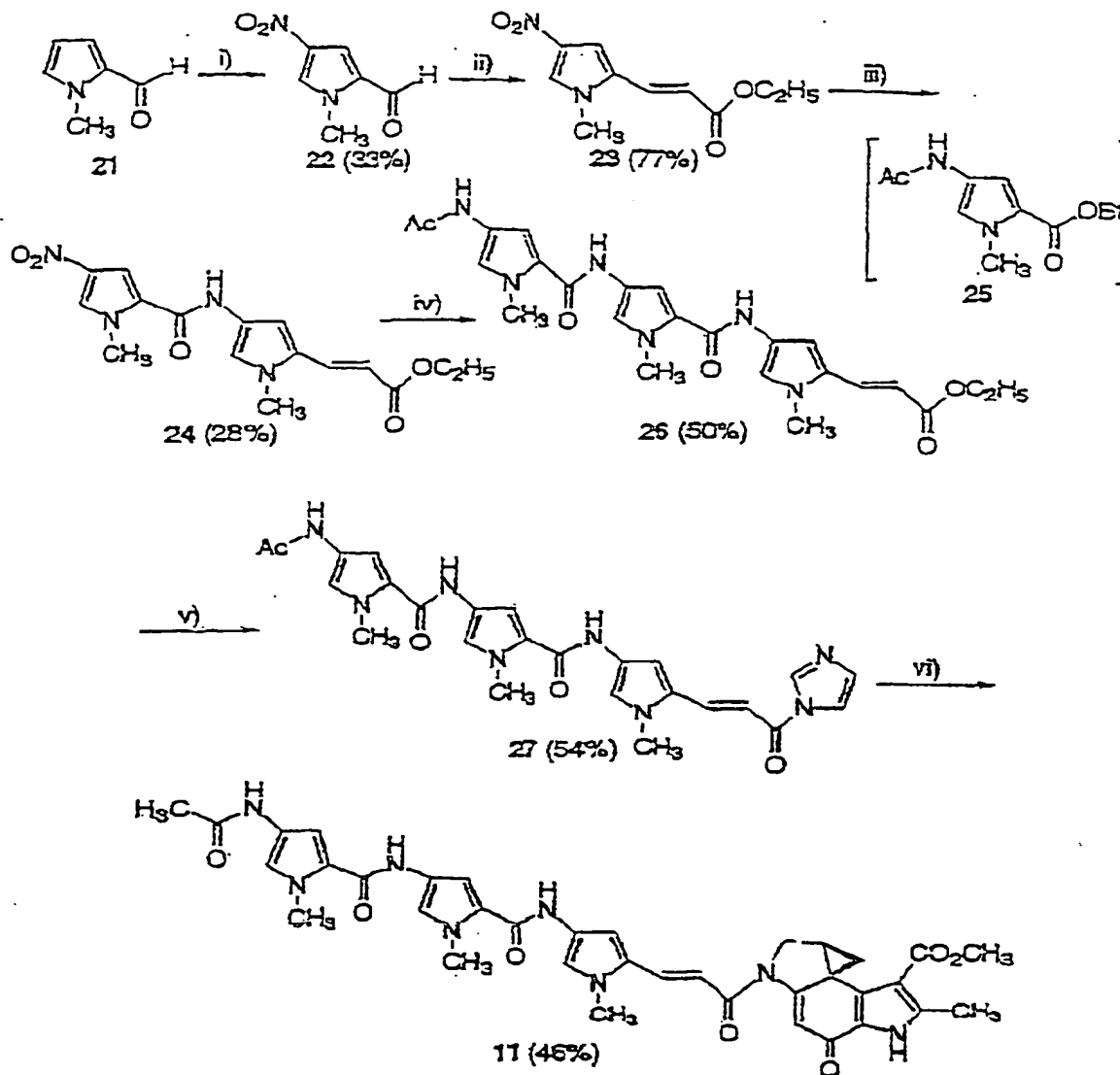
[0066] Results were treated in the same way as in example 1 and survival rate of each cell was calculated.

[0067] In Fig.4, results of the test compounds at the concentration of 100 nM are shown.

[0068] The results indicate that the compound 14 shows a high cytotoxic action only against LCL-wt.

Example 3 (Synthesis of compounds)

[0069] The method of synthesis of the compound 13 is illustrated as follows.



[0070] The commercially available materials were used for reagents used in the reactions and the purifications and solvents. For proton nuclear magnetic resonance spectra (NMR), Nihon Denshi JNM-A500 was used. Tetramethylsilane (TMS) was used as an internal standard substance and chemical shifts were shown by δ -value (ppm). Abbreviations for signals are shown as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), br (broad) and br s (broad singlet). Abbreviations of reagents and solvents are as follows: dimethylformamide (DMF), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), carbonyldiimidazole (CDI), 4-(dimethyl) aminopyridine (DMAP), N-hydroxybenzotriazole (HOBT), 1-[3-(dimethylamino) propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI) and tetrahydrofuran (THF). The reactions were performed, if not specified, under an argon atmosphere or a nitrogen atmosphere.

(1) 1-methyl-4-nitro-pyrrole-2-aldehyde (22)

Acetic anhydride (25 ml) solution of fuming nitric acid (1.5 ml, 37.5 mmol) was cooled at -30°C . Acetic anhydride (10 ml) solution of 1-methylpyrrole-2-carboxyaldehyde (21) (3.27 g, 30.0 mmol) was dropwisely added under the same temperature, and the mixture was stirred at the same temperature for 5 hours. The precipitated solid was filtered to obtain nitro compound (22) (860 mg, 19%). The solvent of the filtrate was removed in vacuo, and the obtained residue was charged on a silica gel column chromatography to obtain an additional (22) (650 mg, 14%) from hexane-ethyl acetate (4 : 1, v/v) eluate.

^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.00(3H, s), 7.40(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 7.65(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 9.61((1H, s);

IR (KBr) ν : 1678, 1535, 1508, 1423, 1406, 1311, 1100, 864, 814, 770, 754 cm^{-1}

(2) Py-L-CO₂Et (23)

Sodium hydride (83 mg, 2.1 mmol) was added to THF (15 ml) solution of triethyl phosphonoacetate (0.39 ml, 2.0 mmol) under ice cooling and stirred for 10 minutes, THF (5 ml) solution of nitro compound (22) was dropwisely added at the same temperature, and stirred at the same temperature for further 45 minutes. Water was added to the reaction mixture and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated aqueous sodium chloride solution and dried by adding anhydrous magnesium sulfate. The solvent was distilled off in vacuo, and the obtained residue was charged on a silica gel column chromatography to obtain ester (23) (225 mg, 77%) from hexane - ethyl acetate (1 : 4, v/v) eluate.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.28(3H,t,J=7.5Hz), 3.75(3H,s), 4.24(2H,q,J=7.5Hz), 6.28(1H,d,J=16.0Hz), 7.09(1H,d,J=2.0Hz), 7.47(1H,d,J=16.0Hz), 7.54(1H,d,J=2.0Hz);

¹³C NMR (CDCl₃) δ: 14.3, 35.4, 60.8, 106.1, 118.4, 125.3, 129.8, 130.1, 136.7, 166.5;

IR (KBr) ν: 1709, 1632, 1510, 1427, 1412, 1373, 1315, 1282, 1176cm⁻¹

(3) Py- Py-L-CO₂Et (24)

To methanol solution (45 ml) of the ester (23) (1.12 g, 5.0 mmol). 10% palladium carbon (250 mg) was added at room temperature. 1 N-sodium borohydride (8 ml) was added to the mixture at the same temperature and stirred for further 10 minutes. After addition of acetone (2 ml), the suspension was passed through Celite and the precipitate was removed. The solvent of the filtrate was distilled off in vacuo and ethyl acetate was added to the obtained residue. The solution was washed with aqueous saturated sodium chloride solution and dried by adding anhydrous magnesium sulfate. The solvent was distilled off in vacuo. The obtained residue was dissolved in methylene chloride (45 ml) and was used for the subsequent reaction. 1-methyl-4-nitro-2-trichloroacetylpyrrole (2.35 g, 7.0 mmol) and N,N-diisopropylethylamine (1.31 ml, 7.5 mmol) were gradually added to the solution at room temperature and stirred at the same temperature for 3 hours. Water was added to the reaction mixture and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with aqueous saturated sodium chloride solution and dried by adding anhydrous magnesium sulfate. The solvent was distilled off in vacuo. The obtained residue was charged on a silica gel column chromatography to obtain bispyrrole (24) (483 mg, 28%) from the ethyl acetate eluate.

¹H NMR (CDCl₃+DMSO-d₆) δ: 1.23(3H,t,J=7.0Hz), 3.59(3H,s), 3.94(3H,s), 4.14(2H,q,J=7.0Hz), 6.01(1H,d,J=15.5Hz), 6.57(1H,d,J=2.0Hz), 7.27(1H,br s), 7.45(1H,d,J=15.5Hz), 7.46(1H,d,J=1.5Hz), 7.50(1H,d,J=2.0Hz), 9.59(1H,br s)

(4) Py- Py- Py-L-CO₂Et (26)

To the suspension of bispyrrole (24) (173 mg, 0.50 mmol) in methanol - ethyl acetate (10 ml - 10 ml), 10% palladium carbon (50 mg) was added at room temperature. 1 N sodium borohydride (1.5 ml) was added to the mixture at the same temperature and stirred for further 2 minutes. The suspension was passed through a silica gel column chromatography to remove the precipitate. The solvent was distilled off in vacuo. The obtained residue was dissolved in DMF (10 ml) and was used for the subsequent reaction. 4-acetamino-1-methylpyrrole-2- carboxylate HOBt ester (25) [Z. -F. Tao, et al., J. Am. Chem. Soc., 121, 4961 - 4967 (1999)] (209 mg, 0.70 mmol) and DMAP (85 mg, 0.70 mmol) were gradually added to the solution and the mixture was stirred at the same temperature for 3 hours. The solvent was distilled off in vacuo and the obtained residue was subjected to a silica gel column chromatography. Tris-pyrrole (26) (120 mg, 50%) was obtained from methanol - ethyl acetate (1 : 9, v/v) eluate.

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.29(3H,t,J=7.0Hz), 2.06(3H,s), 3.59(3H,s), 3.81(3H,s), 3.84(3H,s), 4.20(2H,q,J=7.0Hz), 5.99(1H,d,J=15.5Hz), 6.51(1H,s), 6.58(1H,s), 6.61(1H,s), 6.94(1H,d,J=2.0Hz), 7.13(1H,s), 7.32(1H,d,J=2.0Hz), 7.47(1H,d,J=15.5Hz), 7.78(1H,s), 7.98(1H,s), 8.36(1H,s)

(5) Py- Py- Py-L-CO₂Im (27)

Aqueous 1 N sodium hydroxide solution (1.5 ml) was added to methanol - THF (10 ml - 10 ml) solution of trispyrrole (26) (24 mg, 0.050 mmol) at room temperature, and stirred at room temperature for 5 hours. The solvent was distilled off in vacuo. Aqueous 10% acetic acid solution was added to the obtained residue and the precipitate was filtered to obtain the hydrolysate (13.5 mg). The hydrolysate was used in the next reaction step without further purification. CDI (24.3 mg, 0.15 mmol) was added to DMF (1.5 ml) solution of the hydrolysate (12.8 mg) at room temperature and stirred at the same temperature overnight. Water was added and the precipitate was filtered to obtain imidazole ester (27) (13.5 mg, 54%).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 1.96(3H,s), 3.77(3H,s), 3.82((3H,s), 3.85(3H,s), 6.85(1H,s), 7.08(1H,s), 7.09(1H,s), 7.12(1H,d,J=15.0Hz), 7.14(1H,s), 7.22(1H,s), 7.24(1H,s), 7.47(1H,s), 7.87(1H,d,J=15.0Hz), 7.90(1H,s), 8.66(1H,s), 9.80(1H,s), 9.89(1H,s), 10.03(1H,s)

(6) Py- Py- Py-L-Du86 (11)

60% sodium hydride (2.0 mg, 0.050 mmol) was added to DMF (2 ml) solution of Du86 A segment (28)[S.

Nakamura, et al., J. Med. Chem., 40, 972-979 (1999)] (6.2 mg, 0.024 mmol) under ice cooling and stirred at the same temperature for 10 minutes. Then DMF (1 ml) solution of imidazole ester (27) (12.9 mg, 0.026 mmol) was added at the same temperature and stirred at the same temperature for further 5 hours. After adding sodium phosphate buffer (pH 6.86), water was added and extracted with methylene chloride. The solvent was distilled off in vacuo and the obtained residue was subjected to a silica gel column chromatography. Py- Py- Py-L-Du86 (11) (7.7 mg, 46%) was obtained from methanol - chloroform (1 : 9, v/v) eluate.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 1.29-1.31(1H,m), 1.97(3H,s), 2.07-2.11(1H,m), 2.47(3H,s), 3.72(3H,s), 3.78(3H,s), 3.82(3H,s), 3.83(3H,s), 4.17-4.22(1H,m), 4.27-4.32(1H,m), 6.57(1H,d,J=15.0Hz), 6.83-6.85(br s), 6.86(1H,s), 6.90(1H,s), 7.06(1H,s), 7.15(1H,s), 7.24(1H,s), 7.39(1H,s), 7.57(1H,d,J=15.0Hz), 9.80(1H,s), 9.89(1H,s), 9.94(1H,s), 12.36(1H,s)

Industrial Applicability

[0071] The present invention provides a method for screening a substance specifically acting to specific cells by a simple method within a short time with a high sensitivity as well as by means of an inexpensive mean, a kit and a plate therefor. According to the method of the present invention, drugs acting specifically to cells of patients, for example tumor cells, can be known within a short time. Consequently, tailor-made drugs for treatment depending on tumor cells of an individual patient can be created, and curative drugs with less side effect and a high efficacy for the patient can be provided

[0072] Further, according to the method of the present invention, substances acting to DNA or RNA can be screened conveniently highly sensitively and inexpensively. In addition, a site of action in DNA and RNA of the substance, in which an action to DNA or RNA has been known, can easily be known by the method of the present invention.

Claims

1. A method for detecting or identifying an action of a chemical species A to a substance containing DNA or RNA comprising using the chemical species, which can recognize a base sequence of DNA, represented by the general formula (I):

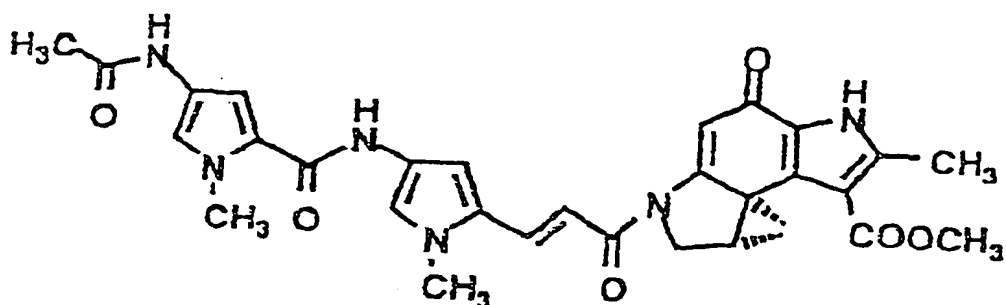


wherein B is a chemical structure containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B.

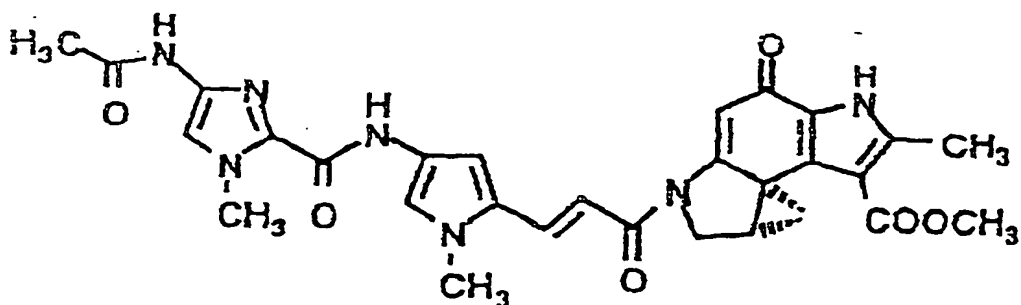
2. The method according to claim 1, for detecting or identifying an action of a chemical species A to a substance containing DNA or RNA comprising providing the compound represented by the general formula (I), which can recognize a base sequence of DNA or RNA in each well of a plate consisting of a plurality of wells, introducing the substance containing DNA or RNA into each well of said plate, reacting completely the compound represented by the general formula (I) with the substance containing DNA or RNA, and assaying a state of the substance containing DNA or RNA.
3. The method according to claim 2, wherein the compound represented by the general formula (I) present in each well is the compound which can recognize a difference of the base sequence of DNA or RNA of the substance containing DNA or RNA and the substance containing DNA or RNA which is introduced into each well is the same substance.
4. The method according to claim 2, wherein the compound represented by the general formula (I) present in each well is the compound which can recognize specific one type of base sequence of DNA or RNA of the substance containing DNA or RNA, and the substance containing DNA or RNA which is introduced into each well is the different substance.
5. The method according to any of claims 1-4, wherein the compound represented by the general formula (I) is immobilized in the well.
6. The method according to any of claims 1-5, wherein the chemical structure containing non-natural bases, which

can recognize a base sequence of DNA or RNA, is the chemical structure which can recognize at least 2 successive bases in natural DNA or RNA of the substance containing DNA or RNA.

7. The method according to any of claims 1-6, wherein the chemical structure containing non-natural bases, which can recognize a base sequence of DNA, is the chemical structure derived from pyrrole and/or imidazole optionally having substituents.
8. The method according to claim 7, wherein the chemical structure derived from pyrrole and/or imidazole optionally having substituents is located in a main chain or is pendent from a main chain.
9. The method according to any of claims 1-8, wherein A having the chemical structure interacting with DNA is a chemical structure of an antitumor agent.
10. The method according to claim 9, wherein the antitumor agent is an alkylating agent.
11. The method according to claim 10, wherein the alkylating agent has a chemical structure having a cyclopropane ring.
12. The method according to any of claims 1-11, wherein the linker, which can link together the chemical structures of A and B, has a chemical structure containing a vinyl group.
13. The method according to any of claims 7-12, wherein the compound represented by the general formula (I) is the compound represented by the formula:



or



14. The method according to any of claims 1-13, wherein the substance containing DNA or RNA is a cell.
15. The method according to claim 14, wherein the cell is a tumor cell.
16. The method according to any of claims 2-15, wherein a mean for assaying a state of the substance containing DNA or RNA is a method for detecting survival or death of the substance.

17. The method according to claim 16, wherein the method for detecting survival or death of the substance is coloring of the substance:

18. A kit for detecting or identifying an action of a chemical species A to a substance containing DNA or RNA to perform the method according to any of claims 1-17.

19. The kit according to claim 18 comprising a chemical species, which can recognize a base sequence of DNA, represented by the general formula (I):



wherein B is a chemical structure containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B;
and equipment or reagents for assaying a state of the substance containing DNA or RNA after treatment.

20. A plate consisting of a plurality of wells comprising presence of a chemical species, which can recognize a base sequence of DNA, represented by the general formula (I):



wherein B is a chemical structure containing non-natural bases which can recognize a base sequence of DNA, A is a chemical structure having an interaction with DNA, and L is a linker which can bind together chemical structures of A and B;
in each well in the plate consisting of a plurality of wells.

21. The plate according to claim 20, comprising a plate for detecting or identifying an action of a chemical species A to a substance containing DNA or RNA.

Fig. 1

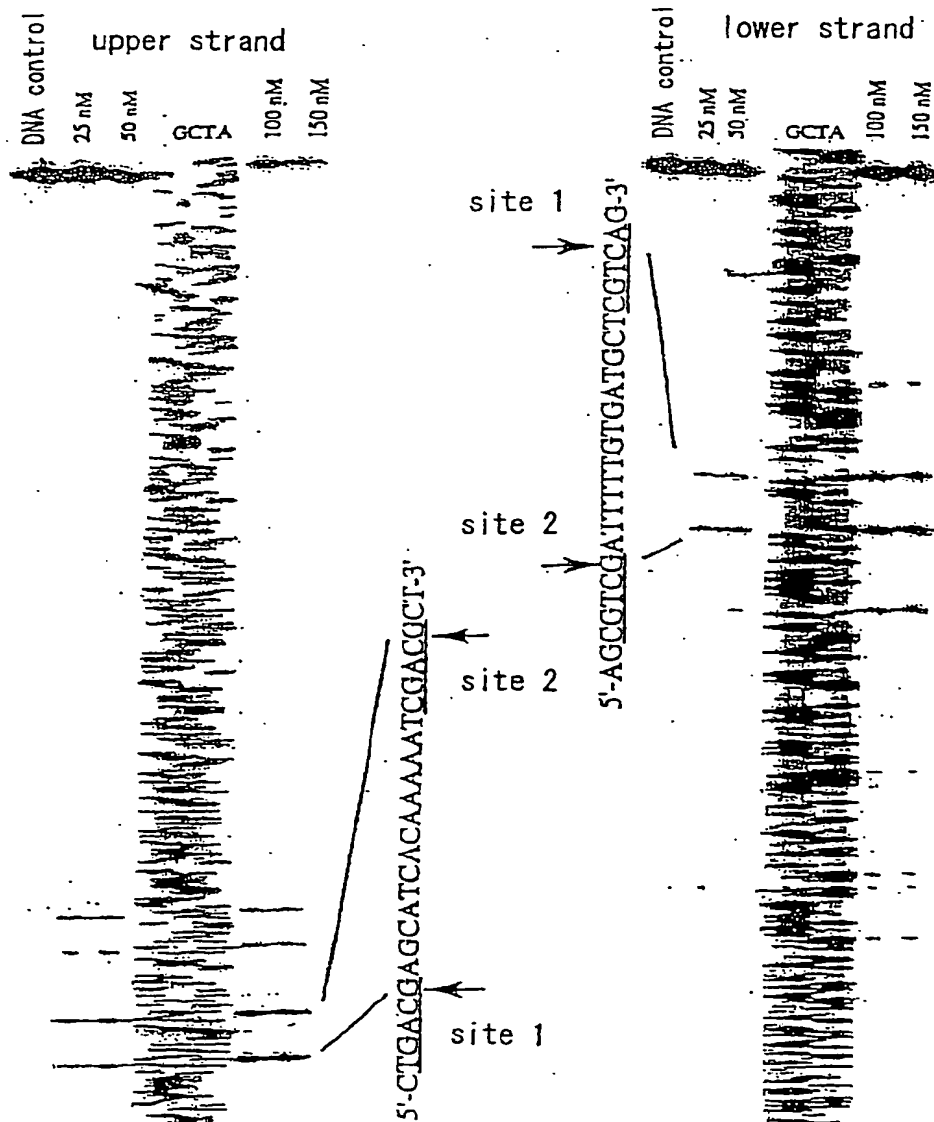
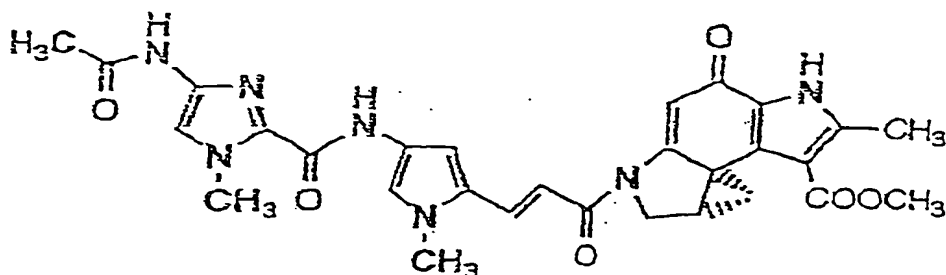


Fig. 2



5'- AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA
 3'- TCTTAGTCCC CTATTGCGTC CTTTCTTGTA CACTCGTTTT CCGGTCGTTT

AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC
 TCCGTCCTT GGCATTTTTTC CGGCGCAACG ACCGCAAAA GGTATCCGAG

site 1 ↓ site 2 ↓
 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG
 CCGGGGGGAC TGCTCGTAGT GTTTTAGCT GCGAGTTCAG TCTCCACCGC

↑ ↑
 AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCTTCT GGAAGCTECC
 TTTGGGCTGT CCTGATATTT CTATGGTCCG CAAAGGGGGA CCTTCGAGGG

TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
 AGCACGCGAG AGGACAAGGC TGGGACGGCG AATGGCCTAT GGACAGGCGG

TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA
 AAAGAGGGAA GCCCTTAGCA CCGCGAAAGA GTTACGAGTG CGACATCCAT

TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC
 AGACTCAAGC CACATCCAGC AAGCGAGGTT CGACCCGACA CACGTGCTTG

CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG
 GGGGGCAAGT CCGGCTGGCG ACGCGGAATA GGCCATTGAT AGCAGAACTC

TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA-3'
 AGGTTGGGCC ATTCTGTGCT GAATAGCGGT GACCGTCGTC GGTGACCATT-5'

Fig. 3

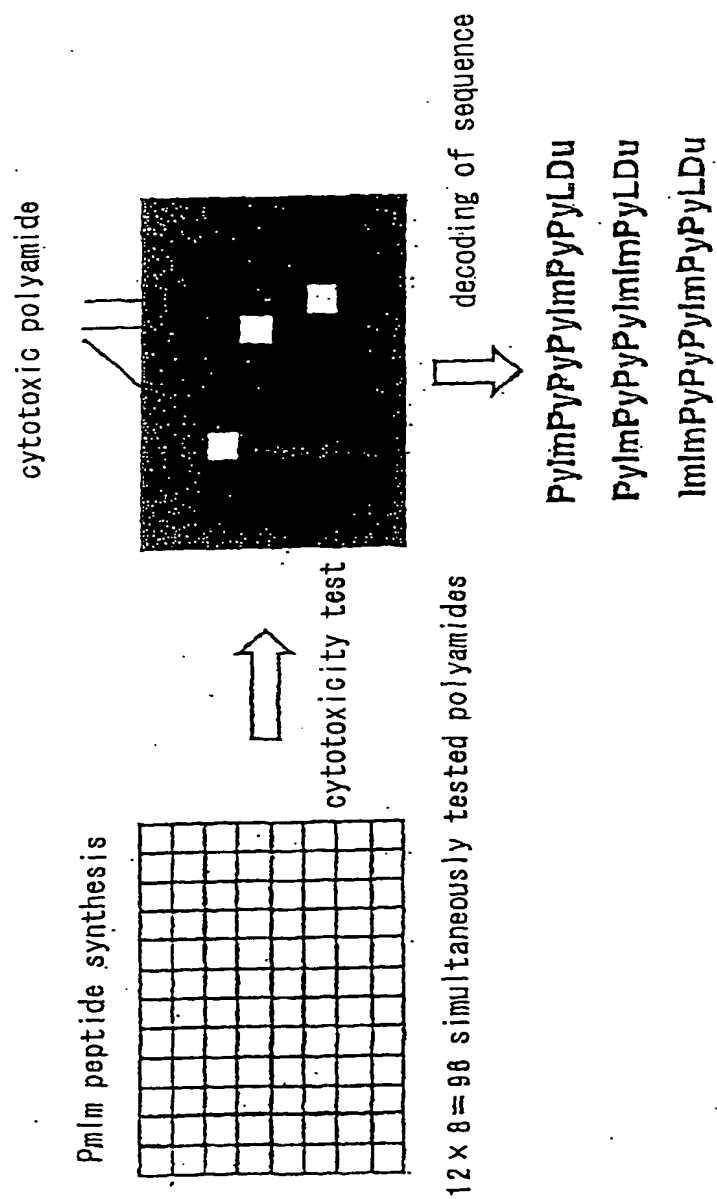


Fig. 4

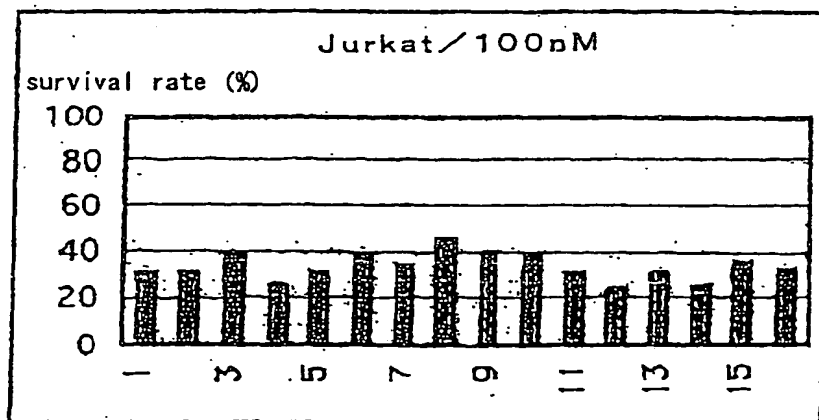
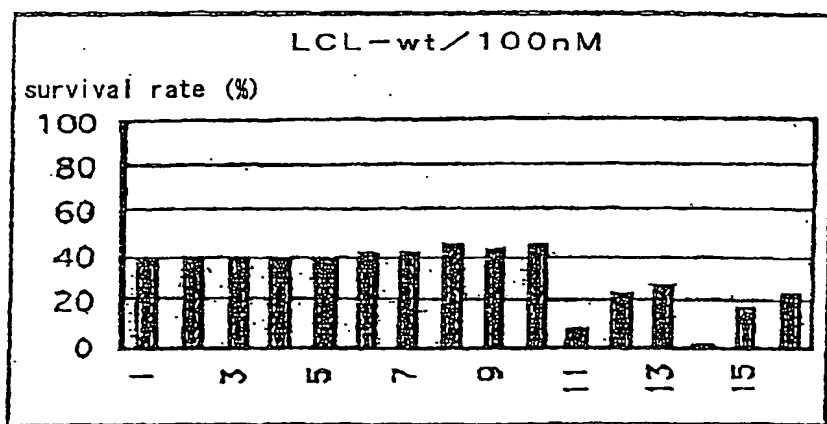
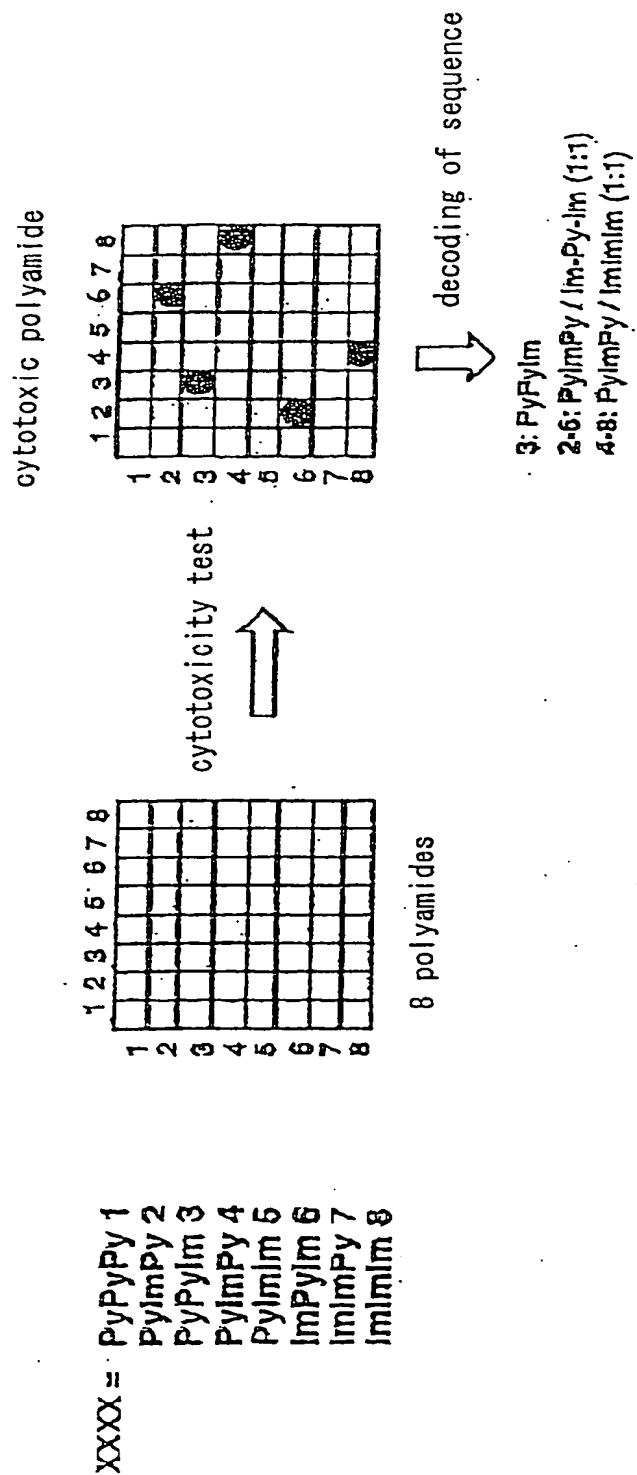


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12Q1/68, C12Q1/02, C12Q1/04, C12N15/09, G01N33/566, G01N33/53, G01N33/15//C07D487/04, A61K31/4178, A61P35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C12Q1/00-1/04, C12N15/00-15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN) REGISTRY (STN) BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 2000/58312, A1 (KAGAKU GIJYUTSU SHINKO JIGYODAN), 05 October, 2000 (05.10.00) & JP, 2000-281679, A	1-21
A	The Chemical Society of Japan (CSJ) ed., "Lecture proceedings II of the 74 th Spring Annual Meeting, the Chemical Society of Japan (CSJ), " (14 March, 1998) 3G309	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 February, 2001 (05.02.01)		Date of mailing of the international search report 13 February, 2001 (13.02.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)



P.B.5818 - Patentamt 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

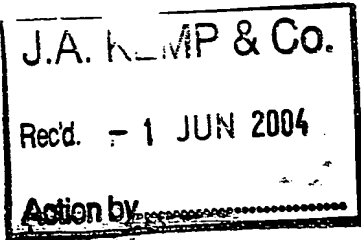
European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Cresswell, Thomas Anthony
J.A. KEMP & CO.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
GRANDE BRETAGNE



Datum/Date

01.06.04

Zeichen/Ref./Réf.

N.84341 TAC/SAR

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

01926081.9-2117-JP0103756

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Japan Science and Technology Agency

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

The following specifications given by the applicant have been approved by the Search Division:

☒ abstract

☒ title

☐ The abstract was modified by the Search Division and the definitive text is attached to this communication.

The following figure will be published together with the abstract: 3

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention shall be considered, for the purposes of subsequent proceedings, as the European search report

EP 01 92 6081

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
E	WO 01/36677 A (JAPAN SCIENCE & TECH CORP ;IIDA HIROKAZU (JP); SAITO ISAO (JP); SU) 25 May 2001 (2001-05-25) -& EP 1 152 061 A 7 November 2001 (2001-11-07)	1-17	C07D519/00 A61K31/40
X	Claims; Formulas (I)-(III); examples 1-3	1-7,9-17	
A	---	8	
X	WO 00/15641 A (JAPAN SCIENCE & TECH CORP ;SAITO ISAO (JP); TAO ZHI FU (JP); SUGIY) 23 March 2000 (2000-03-23) -& US 6 566 336 B1 (SUGIYAMA HIROSHI ET AL) 20 May 2003 (2003-05-20)	1-17	
X	Claims; Fig. 7A-7C; examples 1-4	1-7,9-17	
A	--- -/--	8	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
			C07D A61K
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
INCOMPLETE SEARCH			
The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims:			
Claims searched completely :			
Claims searched incompletely :			
Claims not searched :			
Reason for the limitation of the search: see sheet C			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 10 May 2004	Examiner Kirsch, C
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ----- & : member of the same patent family, corresponding document	



Claim(s) searched completely:
8

Claim(s) searched incompletely:
1-7, 9-17

Reason for the limitation of the search:

Present claims 1-17 relate to compounds of formula A-L-B-X-B-L-A (I) defined by reference to desirable characteristics or properties, namely "capable of recognizing a nucleotide sequence of DNA", "capable of binding to one of the bases of DNA", "links A and B together" and "spacer which binds the component A-L-B".

The claims cover all compounds having these characteristics or properties, whereas the application provides support within the meaning of Article 84 EPC and disclosure within the meaning of Article 83 EPC for only a very limited number of such compounds (7a-7d). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 84 EPC). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds mentioned in claim 8.

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 01 92 6081

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

10-05-2004

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0136677 A	25-05-2001	JP 2001136974 A	22-05-2001
		EP 1152061 A1	07-11-2001
		WO 0136677 A1	25-05-2001
		US 2003099998 A1	29-05-2003
WO 0015641 A	23-03-2000	JP 3045706 B2	29-05-2000
		JP 2000159768 A	13-06-2000
		WO 0015641 A1	23-03-2000
		US 6566336 B1	20-05-2003
WO 0012523 A	09-03-2000	US 6072046 A	06-06-2000
		AU 5785899 A	21-03-2000
		WO 0012523 A1	09-03-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.